



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ VYBRANÝCH
ROSTLINNÝCH ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK**

CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF SOME PLANT ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Agáta Bendová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková PhD.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1128/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Agáta Bendová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Charakterizace a využití vybraných rostlinných antibakteriálních látek

Zadání bakalářské práce:

1. Příprava vybraných rostlinných extraktů
2. Analýza hlavních obsahových látek
3. Enkapsulace aktivních extraktů do organických částic
3. Testování antimikrobiálního účinku

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Agáta Bendová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstakt

Zaměřením a cílem této bakalářské práce bylo studium antioxidačních a především antibakteriálních účinků rostlinných extraktů a liposomů s jejich obsahem. V teoretické části je shrnuta problematika studia přírodních antimikrobiálních látek, rezistence bakterií, dále je zde uvedena stručná charakteristika vybraných bylin a koření, antimikrobiálních a antioxidačních látek a metod použitých při testování.

V experimentální části byly charakterizovány připravené extrakty z 12 druhů bylin a koření (olejové, alkoholové a vodné) z hlediska obsahu polyfenolů a flavonoidů a taktéž z hlediska jejich antioxidační aktivity. Dále byly extrakty enkapsulovány do liposomů, u nichž byla stanovena enkapsulační účinnost, velikost, stabilita a dlouhodobá stabilita. Průměrné velikost liposomů se pohybovaly v intervalu od 100 do 200 nm. Stabilita částic byla testována z hlediska zeta potenciálu a všechny připravené částice byly stabilní. Z hlediska dlouhodobé stability však nebyly liposomové částice dostatečně stabilní.

Antimikrobiální aktivita byla testována proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* a gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. Enkapsulace extraktů do liposomových částic velmi výrazně navýšila jejich antimikrobiální účinek. Z celkového hlediska pak byly vůči oběma kmenům nejúčinnější liposomy s obsahem olejových extraktů z kozince, muškátového oříšku a pepře a liposomy s obsahem alkoholových extraktů z badyánu a hřebíčku. Tyto liposomové částice by tak mohly být možnou alternativou antibiotik a mohou nalézt uplatnění například při aplikaci ve formě různých antimikrobiálních gelů pro kosmetický či farmaceutický průmysl.

Abstract

The main goal of this bachelor thesis was the study of antioxidant and antibacterial effects of natural plant extracts and liposomes. The theoretical part was focused on description of natural antimicrobial and antioxidant substances from selected herbs and spices. Also bacterial resistance and methods used in work were described.

In the experimental part basic characteristics of extracts from 12 kinds of herbs and spices (oil, alcohol and aqueous) were analyzed. Mainly content of polyphenols, flavonoids and the total antioxidant activity were determined. All extracts were also encapsulated into liposomes and the encapsulation effectivity, long-term stability and size and stability of liposomes were determined. The size of prepared liposomes was in range of 100 nm to 200 nm. Stability of the liposome particles was measured using a zeta potential and all prepared particles exhibited very good stability, but in term of long term stability were liposomes relatively unstable.

Antibacterial activity was tested against Gram-positive *Micrococcus luteus* and Gram-negative *Serratia marcescens*. Encapsulation of extracts into liposome particles has greatly increased their antimicrobial effect and liposomes containing oil extracts from the goat, nutmeg and pepper and liposomes containing alcoholic extracts from star anise and cloves were the most effective against both strains. The prepared liposomes could be used as alternative to antibiotics and could be found application in the form of various antimicrobial gels for the cosmetic or pharmaceutical industry.

Klíčová slova: Rostlinné extrakty, antibakteriální aktivita, antioxidační aktivita, liposomy

Keywords: Plant extracts, antibacterial activity, antioxidant activity, liposomes

BENDO VÁ, A. *Charakterizace a využití vybraných rostlinných antibakteriálních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala. Dále bych také chtěla poděkovat prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům za trpělivost a optimismus během celého mého studia.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Význam studia přírodních látek.....	10
2.2	Rezistence mikroorganismů	10
2.3	Antimikrobiální a antioxidační látky	10
2.3.1	Fytoncidy.....	11
2.3.2	Sloučeniny fenolu.....	11
2.3.2.1	<i>Polyfenoly</i>	11
2.3.2.2	<i>Flavonoidy</i>	11
2.4	Zdroje přírodních antimikrobiálních látek.....	11
2.5	Vybrané byliny a koření	13
2.5.1	Badyán.....	13
2.5.2	Dubová kůra	13
2.5.3	Hřebíček	13
2.5.4	Kozinec.....	13
2.5.5	Lapacho	13
2.5.6	Lichořeřišnice.....	14
2.5.7	Muškatový oříšek	14
2.5.8	Oregáno	14
2.5.9	Pepř černý.....	14
2.5.10	Pomerančová kůra	15
2.5.11	Skořice.....	15
2.5.12	Zázvor.....	15
2.6	Metody stanovení antimikrobiální aktivity.....	15
2.6.1	Diluční metody	15
2.6.1.1	<i>Agarová diluční metoda</i>	16
2.6.1.2	<i>Bujónová diluční metoda</i>	16
2.6.2	Difúzní metody.....	16
2.6.2.1	<i>Difúzní disková metoda</i>	16
2.6.2.2	<i>Agarová difúzní metoda</i>	16
2.6.3	Epsilon test	16
2.7	Využití antimikrobiálních a antioxidačních látek v kosmetice.....	17
2.8	Enkapsulace	17
2.8.1	Liposomy.....	17
2.8.1.1	<i>Lecithin</i>	18
2.8.1.2	<i>Cholesterol</i>	19
2.8.2	Metody přípravy liposomů	19
2.8.2.1	<i>Ultrazvuková metoda</i>	19
2.8.2.2	<i>Odpařování na tenké vrstvě</i>	19

2.8.3	Aplikace liposomů v kosmetice	19
2.9	Metody charakterizace připravených částic	19
2.9.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	20
2.9.1.1	UV-VIS spektrofotometrie	20
2.9.2	Stanovení stability částic	20
2.9.3	Stanovení velikosti částic	20
2.10	Kultivace mikroorganismů	21
2.11	Použité mikroorganismy	21
2.11.1	Gramnegativní mikroorganismy	22
2.11.1.1	<i>Serratia marcescens</i>	22
2.11.2	Grampozitivní mikroorganismy	22
2.11.2.1	<i>Micrococcus luteus</i>	23
3	Cíle práce	24
4	Experimentální část	25
4.1	Použité přístroje a chemikálie	25
4.1.1	Použité přístroje a pomůcky	25
4.1.2	Použité chemikálie	25
4.2	Použité mikroorganismy	25
4.3	Použité byliny a koření	26
4.4	Příprava extraktů	26
4.4.1	Příprava vodných extraktů	26
4.4.2	Příprava alkoholových extraktů	26
4.4.3	Příprava olejových extraktů	26
4.5	Charakterizace extraktů	26
4.5.1	Stanovení celkové koncentrace polyfenolů	26
4.5.2	Stanovení celkové koncentrace flavonoidů	27
4.5.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	27
4.6	Příprava liposomů	27
4.6.1	Příprava liposomů z vodných extraktů	27
4.6.2	Příprava liposomů z alkoholových extraktů	27
4.6.3	Příprava liposomů z olejových extraktů	28
4.7	Charakterizace připravených liposomů	28
4.7.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	28
4.7.2	Stanovení dlouhodobé stability liposomů	28
4.7.3	Stanovení stability a velikosti liposomů	28
4.8	Kultivace mikroorganismů	28
4.8.1	Příprava médií	29
4.9	Antimikrobiální testy	29
4.9.1	Bujónová diluční metoda	29
4.9.1.1	Příprava vzorků	29

4.9.2	Agarová difúzní metoda	29
4.10	Příprava gelu s antimikrobiální látkou.....	29
5	Výsledky a diskuze	30
5.1	Charakterizace extraktů	30
5.1.1	Stanovení celkové koncentrace polyfenolů.....	30
5.2	Stanovení celkové koncentrace flavonoidů	32
5.3	Stanovení antioxidační aktivity	34
5.4	Příprava částic.....	35
5.5	Stanovení velikosti připravených částic	36
5.6	Stanovení stability připravených částic	38
5.7	Stanovení enkapsulační účinnosti liposomů.....	39
5.8	Stanovení dlouhodobé stability liposomů.....	40
5.9	Antimikrobiální testy	42
5.9.1	Kmen <i>Micrococcus luteus</i>	42
5.9.1.1	Olejové extrakty a liposomy	42
5.9.1.2	Alkoholové liposomy.....	44
5.9.1.3	Vodné extrakty a liposomy.....	44
5.9.2	Kmen <i>Serratia marcescens</i>	46
5.9.2.1	Olejové extrakty a liposomy	46
5.9.2.2	Alkoholové liposomy.....	47
5.9.2.3	Vodné extrakty a liposomy.....	48
5.9.3	Srovnání antimikrobiální účinnosti liposomů	49
5.10	Příprava gelů.....	50
6	Závěr	52
7	Seznam použité literatury.....	54
8	Seznam použitých zkratk	59

1 ÚVOD

V posledních letech se vědci stále častěji zabývají možnostmi využití přírodních látek v různých odvětvích lidského života. Výsledky řady studií ukazují, že přírodní látky lze široce využívat. Jejich uplatnění je možné nalézt v potravinářském, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu.

U řady přírodních látek byly zjištěny vysoké antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, u některých byly prokázány také inhibiční účinky na růst celé řady mikroorganismů od bakterií až po plísňe, včetně dalších parazitů.

Zájem o výzkum antimikrobiálních vlastností přírodních látek vzrůstá také z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů k používaným antibiotikům. Dalšími důvody rostoucí preference přírodních látek jsou jejich minimální vedlejší účinky, nízká toxicita, snadnější odbourávání ve srovnání s antibiotiky a dobrá dostupnost.

Využívány jsou různé extrakty z rostlin, ale také jednotlivé složky, které jsou v extraktech obsaženy. Účinné látky lze z rostlin získat moderními analytickými metodami a testování jejich antibakteriální aktivity je prováděno stejně jako u antibiotik.

Tato práce se zaměřuje na zkoumání antibakteriálních účinků extraktů z vybraných bylin a koření (olejové, alkoholové a vodné extrakty). Testování extraktů se zaměřuje především na možné aplikace do kosmetického a farmaceutického průmyslu. V extraktech jsou sledovány hlavně koncentrace polyfenolů a flavonoidů. Jedná se totiž o nejběžnější antimikrobiální a antioxidační sloučeniny obsahované v rostlinách.

Polyfenoly a flavonoidy jsou látky, které mohou podporovat účinek antibiotik nebo mít inhibiční efekt proti bakteriím samy o sobě. Mají také antioxidační účinky, napomáhají tedy ochraně buněk v lidském těle proti oxidačnímu stresu. V kosmetickém průmyslu je možná jejich aplikace v různých hojivých krémech s protizánětlivými účinky a v krémech proti stárnutí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Význam studia přírodních látek

Přírodní látky jsou v lékařství a léčitelství využívány již od nepaměti. Biologická aktivita těchto látek zahrnuje antibakteriální, antimykotické, antivirové a antiparazitické účinky. Dále mohou působit protizánětlivě a antioxidačně, také byl u některých látek prokázán antikarcinogenní efekt. Díky těmto poznatkům dochází k neustálému rozšiřování výzkumu a uplatnění přírodních látek v medicíně při léčbě řady infekčních chorob [1].

Vzrůstající rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům se stává celosvětovým problémem. Kvůli narůstající rezistenci mikroorganismů se stala poměrně velká část antibakteriálních látek neúčinná, a proto dochází k hledání nových bioaktivních sloučenin s antimikrobiálními účinky, které by byly vhodné k léčbě chorob samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky [2].

O možnostech využití přírodních látek v kombinaci s antibiotiky je široký zájem, protože přírodní látky mají široké spektrum účinků. Dalšími výhodami je jejich dostupnost, biodegradabilita, menší počet vedlejších účinků a nízká toxicita, ve srovnání s dostupnými antibiotiky. Jejich velký potenciál je využíván v medicíně, potravinářském průmyslu, kosmetickém průmyslu a farmakologii [1].

2.2 Rezistence mikroorganismů

Již od začátku 21. století se vědecká komunita zabývá otázkou vzrůstající rezistence bakterií proti antibiotikům. Rezistence neboli odolnost, je přirozený biologický jev, způsobený příliš častým či špatným užíváním antibiotik, bakterie jsou poté schopny přestát útok antibiotik. Tato odolnost může vzniknout mutací nebo získáním genů rezistence od jiné bakterie, jež odolná byla již dříve [3].

Možnou prevencí proti vzniku rezistence je omezení užívání antibiotik jen na nutné případy. Další možností je obměna používaných antibiotik, tedy střídání typů antibiotik s podobnými účinky, ale rozdílným složením. Součástí boje proti rezistentním kmenům bakterií je stanovování citlivosti bakterií pomocí stěrů ze sliznic pacientů a následným testováním mikroorganismů [3].

Žádanou alternativou se stávají kombinace komerčních antibiotik s přírodními antimikrobiálními látkami. I když samotné přírodní antimikrobiální látky nemají dostatečný účinek k inhibici růstu mikroorganismů, mohou napomoci při narušení vytvořené rezistence proti antibiotiku a tak úspěšně potlačit bakteriální infekci [1] [2].

2.3 Antimikrobiální a antioxidační látky

Antimikrobiální látky se vyznačují schopností inhibovat růst mikroorganismů. Podle jejich aktivity je dále možné tyto látky dělit na antibakteriální, antimykotické, antiparazitické a antivirové. Antioxidační látky jsou často spojovány s blahodárnými účinky na zdraví člověka. Antioxidanty se podílí na ochraně proti volným radikálům, které se ve větším množství tvoří při patogenních stavech [4] [5].

V rostlinách jsou tyto látky stavebními a strukturními složkami, které zprostředkovávají ochranu proti škůdcům, chladu, infekcím, mechanickému poškození a dalším stresovým faktorům. Jsou odpovědné za vlastnosti květů a plodů, jako jsou vůně, barva a chuť. Z chemického hlediska se nejčastěji jedná o fenolické látky [4] [5].

Antimikrobiální účinek může být ovlivněn řadou faktorů, například botanickým zdrojem, dobou sklizně, fází vývoje a způsobem extrakce. Pro určení aktivity antimikrobiálních látek se využívá řada metod, ty jsou založeny na podobném principu [4] [5].

2.3.1 Fytoncidy

Fytoncidy se řadí do skupiny takzvaných biocidů. Pojem biocid je užíván k označení látek, které hubí, tlumí či omezují růst škodlivých organismů v různých oblastech lidské činnosti. Za fytoncidy jsou označovány látky rostlinného původu, které mají léčivé účinky. Tyto látky jsou také označovány jako rostlinné antibiotikum, díky své schopnosti bránit růstu mikroorganismů. Z fyziologického hlediska se jedná o velmi účinné látky, toxické pro bakterie, houby a prvoky, jež lze nalézt v pletivech některých druhů rostlin [6].

Mezi dobře známý fytoncid je možné řadit allicin, který je obsažen v česneku a má antibakteriální účinky [6].

2.3.2 Sloučeniny fenolu

2.3.2.1 Polyfenoly

Polyfenoly, odvozené od fenylpropanu, jsou jednou z nejčastějších skupin rostlinných metabolitů a jsou nedílnou součástí lidské stravy. Pro polyfenoly je charakteristická přítomnost fenolové jednotky v molekule. Obecné dělení polyfenolů je na taniny, flavonoidy a ligniny. Bylo dokázáno, že poloha a počet hydroxylových skupin ve fenolické struktuře ovlivňuje antimikrobiální aktivitu a zvýšení hydroxylace vede ke zvýšené toxicitě [7] [8].

Mezi hlavní zástupce patří kyselina skořicová a kávová. Tyto kyseliny, které jsou obsažené například v estragonu a mateřídoušce, vykazují vysoké antibakteriální, antivirové a antimykotické účinky [7] [8].

2.3.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky, které jsou v rostlinách prakticky všudypřítomné. Jejich příkladem jsou pigmenty odpovědné za barvu listů. Vlastnostmi se odlišují od jiných polyfenolických pigmentů, to je důvodem, proč jsou často uváděny jako samostatná skupina. [9]

Tato skupina látek se řadí mezi nejsledovanější skupiny přírodních látek s antimikrobiálními účinky. Známé je jejich antioxidační působení, které se odvíjí od počtu a polohy hydroxylovaných skupin v molekule. Jsou to velmi účinné lapače volných hydroxylových a peroxylových radikálů. Flavonoidy jsou hydroxylované fenolické aromatické sloučeniny, které jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu. Flavan tvoří dva benzenové kruhy spojené heterocyklickým pyranem [7] [8].

Antimikrobiální aktivita je pravděpodobně založena na tvorbě komplexů s extracelulárními rozpustnými proteiny a sloučeninami v buněčné stěně mikroorganismů. Dále mohou cytoplazmatickou membránu narušovat i lipofilní flavonoidy [7] [8].

2.4 Zdroje přírodních antimikrobiálních látek

Přírodní látky jsou získávány převážně z rostlin a účinné složky se mohou nacházet v celé rostlině nebo pouze v její části. Mohou být obsaženy v nadzemní části – listy, květy, nať, pupen, lodyha, semeno a podzemní části – kořen, oddenek, hlíza [8] [10] [11].

Využívání rostlin a zjišťování jejich léčivých schopností má dlouhou tradici. Rostliny disponují schopností syntetizovat aromatické sloučeniny, kterými jsou schopny různými mechanismy ovlivňovat živé organismy. U některých rostlin tak byla objevena schopnost

vytvářet sloučeniny s léčivými účinky a s antimikrobiální aktivitou. Tyto sloučeniny jsou rostlinami často využívány na jejich ochranu proti mikroorganismům, hmyzu či býložravcům. Velká část těchto sloučenin jsou fenoly nebo jejich kyslíkaté deriváty. Některé z těchto složek zapříčiňují typickou vůni rostlin nebo jsou zodpovědné za jejich barvu, například tříslovina a chinony. Dále je možné zmínit kapsaicin, což je terpenoid obsažený v chilli papričkách, který je příčinou jejich charakteristické pálivé chuti, podílí se však i na antimikrobiálním účinku [8] [10] [11].

Velmi často využívaná antimikrobiální aktivita esenciálních olejů přírodních látek se odvíjí od jejich složení, struktury daných komponent, funkčních skupin a možných synergických interakcí mezi komponenty [8] [10] [11].

Přehled některých rostlin s antimikrobiálními účinky uvádí tabulka 1 [8].

Tabulka 1: Příklady rostlin obsahující látky s inhibičními účinky na mikroorganismy [8]

běžný název	přírodovědný název	účinná složka	skupina	inhibiční účinky
Aloe Vera	<i>Aloe barbadensis</i>	latex	komplexní směs	antibakteriální
Bazalka vonná	<i>Ocimum basilicum L.</i>	kyselina rozmarýnová	fenolická kyselina	antivirové, antibakteriální
Benedikt lékařský	<i>Cnicus benedictus L.</i>	knicin	laktónové hořčiny	antibakteriální
Blahovičník	<i>Eucalyptus spp.</i>	p-cymen	monoterpen	antibakteriální, antivirové, fungicidní
Cibule	<i>Allium cepa</i>	allicin	sulfoxid	antibakteriální
Česnek	<i>Allium sativum</i>	allicin	sulfoxid	antibakteriální
Dřišťál obecný	<i>Berberis vulgarit</i>	berberin	alkaloid	antibakteriální
Henna	<i>Lawsonia dermis</i>	kyselina gallová	fenol	antibakteriální
Hrušeň	<i>Prus spp.</i>	hydrochinon	fenol	antioxidační, antibakteriální
Hřebíčkovec kořený	<i>Syzigium aromaticum</i>	eugenol	terpenoid	antivirové, fungicidní
Jedle bělokorá	<i>Pini sibirica</i>	limonen	terpen	antibakteriální, antivirové, fungicidní
Jinan dvoulaločný	<i>Ginkgo biloba L.</i>	quercetin	flavonoidní glykosid	antibakteriální
Konopí	<i>Cannabis sativa</i>	kyselina resorcylová	organická kyselina	antibakteriální, antivirové
Měsíček lékařský	<i>Calendula officinalis</i>			antibakteriální
Saturejka horská	<i>Satureja montana</i>	carvacrol	terpenoid	antibakteriální
Tymián obecný	<i>Thymus vulgaris</i>	thymol	fenolický alkohol	antibakteriální, antivirové, fungicidní
Zelený čaj	<i>Camellia sinensis</i>	katechin	flavonoid	antibakteriální, antivirové

2.5 Vybrané byliny a koření

2.5.1 Badyán

Badyán je sušený plod hvězdíkovitého tvaru, pocházející z badyánu pravého, jehličnatého stromu s purpurově červenými květy, který roste výhradně v Číně a ve Vietnamu. Plod je důležitou součástí tradiční čínské medicíny a běžně se používá jako koření [12].

Ve zveřejněné studii bylo charakterizováno složení badyánu a zkoumána jeho fungicidní účinnost. Výsledky potvrzují, že badyán je dobrý zdroj přírodních látek s antioxidačními a antimikrobiálními účinky. Proto by mohly být esenciální oleje z badyánu použity v různých průmyslových odvětvích, jako je kosmetický, farmaceutický nebo potravinářský průmysl [12].

2.5.2 Dubová kůra

Duby jsou dlouhověké, opadavé nebo stálezelené stromy, které se hojně vyskytují v mírných a subtropických oblastech severní polokoule [13].

Dubová kůra se používá v léčitelství na ošetření ran, vředů a gynekologických potíží již od 16. století. Dále je známé její využití jako součást léčivé lázně při kožních onemocněních, ekzémech, při popálení. Kůra obsahuje velké množství třísloviny (až 20 %), a to zapříčiňuje její vysušující, antimikrobiální a protizánětlivé účinky [13].

Pro lékařské účely se používá kůra ze tří druhů dubů a to jmenovitě z *Quercus robur L.*, *Quercus petrae (Matt) Liebl* a *Quercus pubescens Willd* [13].

2.5.3 Hřebíček

Pod názvem hřebíček jsou označována poupata hřebíčkovce, což je tropický, stálezelený strom. Z květů hřebíčkovce se lisuje hřebíčková silice [16].

Hřebíček má především využití v gastronomii, ale používá se také ve farmacii, konkrétně ve stomatologii jako přísada do zubních past a ústních vod. Vykazuje antiseptické, antimikrobiální, antioxidační a cytotoxické vlastnosti [16].

Hlavní složkou hřebíčkového oleje je eugenol, který způsobuje typickou vůni pupenů hřebíčku a byla u něj studována antimykotická a antiseptická účinnost [14] [15] [16].

2.5.4 Kozinec

Kozinec je vytrvalá rostlina původem z Číny, Mongolska a Koreje. Léčivou částí rostliny je nejčastěji kořen, ale je možné použít i kvetoucí nať. Kozinec je označován jako adaptogen, což je termín vysvětlující jeho schopnost ochrany organismu proti fyzickému a duševnímu stresu. Mezi jeho další prospěšné vlastnosti patří antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a antivirové účinky [16].

Jedním z nejvíce pozoruhodných výzkumů, byla studie zaměřená na použití kozince při léčbě rakoviny. Byly provedené testy na buněčné linii lidského karcinomu tlustého střeva a výsledky ukázaly, že bylinný extrakt způsoboval inhibici růstu buněk [17].

Ačkoliv má kozinec velký potenciál, množství důkazů o jeho účincích je prozatím velmi malé [16] [17].

2.5.5 Lapacho

Lapacho je stálezelený strom rostoucí v Jižní Americe. Kůra a jaderné dřevo tohoto stromu bylo pro své léčivé účinky používáno již indiány a to při léčbě chorob jako je horečka,

rakovina, malárie, plísňová a bakteriální infekce. Lapacho bývá často označováno za „záračný lék“ [18].

Lapacho se nejběžněji užívá ve formě odvaru, který je účinný proti vředům, ekzémům a kožním onemocněním. V dnešní době je tento strom často zkoumán pro své účinky při léčbě rakoviny. Mezi hlavní sloučeniny odpovědné za protinádorovou aktivitu jsou považovány lapachol a β -lapachon [18].

2.5.6 Lichořeřišnice

Lichořeřnice je nejběžněji pěstována jako okrasná květina, která původně pochází z Jižní Ameriky. Její květy, listy a semena jsou jedlá a obsahují vysoké koncentrace vitamínu C. Tinktury z lichořeřišnice se užívají při urologických onemocnění [19].

Esenciální olej z nadzemní části lichořeřišnice byl v nedávné studii testován na antimikrobiální aktivitu. Analýza oleje odhalila přítomnost mastných kyseliny, sterolů, karotenoidů a flavonoidů. Získané výsledky potvrdily antimikrobiální a protizánětlivé účinky oleje [20].

2.5.7 Muškátový oříšek

Muškatový oříšek je vysušené semeno ze stromu muškátovníku, který se pěstuje v tropických oblastech. Muškátový květ se používá jako koření a oleje lisované ze semen se používají při výrobě mastí a mýdel, silice se používají v lékařství, potravinářství a kosmetice, a to například při výrobě voňavek [16].

Muškatový oříšek má antioxidační a antimikrobiální účinky. Ve zveřejněné studii byla připravena řada extraktů z těchto semen a byla otestována jejich aktivita. Jako nejúčinnější se zde ukázal extrakt acetonu, ten prokázal účinnosti proti všem testovaným bakteriím i plísním [21].

2.5.8 Oregáno

Oregáno, jiným názvem dobromysl, je trvalka rostoucí v mírném a subtropickém pásu Evropy a Asie. Rostlina je typická svou pronikavou vůní a je používána jako koření. Oregáno má také pozitivní vliv na nervový systém, podává se při léčbě kašle a má protizánětlivé vlastnosti [16]. Pro své léčivé účinky bylo oregáno často zkoumáno. Při analýze esenciálního oleje získaného z oregána pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií byly jako hlavní složky identifikovány terpinen-4-ol (24,90 %), γ -terpinen (10,57 %), *o*-cymen (8,90 %), *cis*- β -terpineol (8,73 %), α -terpinen (6,67 %), β -felandren (4,84 %), α -terpieol (4,18 %) a karvakrol (3,90 %). Dále byly vyhodnoceny antimikrobiální účinky silice a nejvíce citlivé byly mikroorganismy *Bacillus cereus*, nejvyšší odolnost prokázaly mikroorganismy *Pseudomonas aeruginosa*. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena v rozmezí od 1,56 do 50 μ l/ml. Extrakt vykazoval i antioxidační aktivitu [22].

2.5.9 Pepř černý

Pepř je plodem pepřovníku, což je rostlina pocházející z Indie. Pepř je jedno z nejvíce známých a používaných koření odpovědné za ostrost jídla. Pepř obsahuje esenciální oleje, jejichž hlavními složkami jsou terpenové uhlovodíky, oxidované terpeny a aromatické sloučeniny [23].

Esenciální oleje z černého pepře vykazují antioxidační a protizánětlivé účinky. Jako hlavní složky oleje byly identifikovány karyofylen a limonen [24].

2.5.10 Pomerančová kůra

Pomeranče jsou plody pomerančovníku, jsou chráněny kožovitým oplodím – pomerančovou kůrou, která se skládá z vnější oranžové části s množstvím siličných nádržek a ze střední části nazvané albeno. Pomerančová silice se používá do voňavek a léků [16].

Sušená pomerančová kůra má také vysoký obsah flavonoidů, a proto se tradičně používá při léčbě různých trávicích poruch. Analýza flavonoidů v pomerančové kůře odhalila přítomnost polymethoxylovaných flavonů, C- nebo O-glykosylovaných flavonů, flavonolů a mnoha dalších fenolických kyselin, spolu s příbuznými deriváty. Tyto citrusové flavonoidy jsou známy svou antioxidační, protizánětlivou a antikarcinogenní aktivitou [25].

2.5.11 Skořice

Skořice je získávána ze stromu skořicovníku a konkrétně se jedná o kůru tohoto stromu, který pochází ze Srí Lanky. Běžně se používá v potravinářství, likérnictví a vinařství, v tradičním léčitelství byla skořice podávána při respiračních a zažívacích onemocněních [16].

Méně známé jsou příznivé vlivy skořice, jakožto antioxidantu, protizánětlivého, antidiabetického, antimikrobiálního a protinádorového činidla. Aktivní složky skořice inhibují růst *Listeria* a *Escherichia coli* v potravinářských produktech, čímž prodlužuje jejich trvanlivost. Hlavní složkou esenciálního oleje skořicové kůry je cinnamaldehyd (až 90 %) [16] [26].

2.5.12 Zázvor

Zázvor je vytrvalá bylina pocházející z Asie. Oddenek se používá jako koření. Dále je hojně používán i v léčitelství. Zázvor má antibakteriální a protizánětlivé účinky, pomáhá také například proti nachlazení. Obsahuje aromatické látky, jeho ostrou a výraznou chuť způsobuje gingerol [16] [27].

U extraktů z oddenku zázvoru byla zkoumána antimikrobiální aktivita a závislost jejich účinků na použitém rozpouštědle. Extrakce byla provedena v nepolárních (petrolej, chloroform) a polárních (methanol, voda) rozpouštědlech. *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* vykazovaly značnou citlivost na všechny extrakty. Vodné a methanolové extrakty prokázaly dobrou účinnost proti *Escherichia coli*. Gramnegativní *Salmonella typhi* byla však odolná vůči všem extraktům. Studie nejenže potvrdila antimikrobiální aktivitu zázvoru, ale také potvrdila, že je aktivita extraktu závislá na polaritě zvoleného rozpouštědla [28].

2.6 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

K testování jsou zapotřebí mikroorganismy ve vhodně zvolených kultivačních médiích. Metody používané k testování antimikrobiální aktivity látek se dělí na difúzní a diluční [29] [30].

2.6.1 Diluční metody

Diluční metody se využívají především pro kvantifikaci a určení hodnoty MIC, tzv. minimální inhibiční koncentrace. Tato hodnota určuje nejnižší koncentraci látky, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Vyhodnocuje se růst, tedy spíše nepřítomnost růstu mikroorganismů. Tyto metody nám podávají přesné informace o množství a účinku antimikrobiální látky, avšak je důležité přidat do kultivačního média přesné množství zkoumané látky. Testování lze provádět na pevných i tekutých médiích [29] [30].

2.6.1.1 Agarová diluční metoda

Tato metoda zjišťuje minimální inhibiční koncentraci na agarovém médiu. Na médium jsou aplikovány různé koncentrace testované antimikrobiální látky. Po nanesení kultury mikroorganismů a po inkubaci se hledá nejnižší koncentrace testované látky, která způsobuje inhibici růstu zkoumaného kmene mikroorganismů. Metoda se používá k vyhodnocení nových antimikrobiálních látek, slouží jako srovnávací metoda [29] [30].

2.6.1.2 Bujónová diluční metoda

Při této metodě se používají mikrotitrační destičky, do nichž je pipetováno médium, které obsahuje klesající koncentraci antimikrobiální látky. Místo mikrotitrační destičky je možné použít řadu zkumavek. Vyhodnocení probíhá po uplynutí daného časového úseku, například po 24 hodinách. Hledá se minimální inhibiční koncentrace látky, tedy vzorek kde nevznikl zákal nebo sediment, který ukazuje růst mikroorganismů. Porovnávání se provádí měřením absorbance, turbidimetricky, pomocí průtokové cytometrie nebo vizuálně [1] [29] [30].

2.6.2 Difúzní metody

Princip těchto metod spočívá v difúzi antimikrobiální látky ze zdroje do okolí, to vytváří klesající koncentrační gradient, ten brání růstu mikroorganismů a vznikají tzv. inhibiční zóny. Tyto metody jsou jednoduché a poměrně rychlé, proto se také často používají, provádí se na pevném agaru [29] [30].

2.6.2.1 Difúzní disková metoda

Princip difúzní diskové metody je následující, na pevné médium je naočkována testovaná kultura mikroorganismů stanovené koncentrace a antimikrobiální látka se aplikuje do média na papírovém disku. Při uvolňování vody z media dochází k difúzi antimikrobiální látky a kolem papírového disku se vytváří koncentrační gradient testované látky, inhibiční zóna, která inhibuje růst mikroorganismů. Při použití papírových disků napuštěných antimikrobiální látkou různé koncentrace lze určit i účinné koncentrace testované látky. Tato metoda je velmi jednoduchá [29] [30].

2.6.2.2 Agarová difúzní metoda

Agarová difúzní metoda je principiálně shodná s difúzní diskovou metodou. Rozdíl je v aplikaci antimikrobiální látky. Během této metody je antimikrobiální látka aplikována do předem vytvořených jamek v agarovém médiu. Opět vznikají inhibiční zóny a určuje se minimální inhibiční koncentrace stejným principem jako u difúzní diskové metody [1] [29] [30].

2.6.3 Epsilon test

Epsilon test, zkráceně E-test je metoda kombinující diluční a difúzní metody a nejvíce se podobá difúzní diskové metodě. Rozdílem je to, že touto metodou je možné zcela přesně stanovit i hodnotu minimální inhibiční koncentrace. Na pevný agar je naočkována zkoumaná kultura mikroorganismů, poté se na agar aplikuje E-testový proužek, ten na svých krajích vytváří koncentrační gradient antimikrobiální látky. Po uplynutí určité inkubační doby, kdy se antimikrobiální látka uvolňovala do agaru a inhibovala růst mikroorganismů, došlo k vytvoření inhibiční zóny tvaru elipsy. Minimální inhibiční koncentrace se zjišťuje v místě, kde se protíná okraj testového proužku s okrajem vytvořené inhibiční zóny [31].

2.7 Využití antimikrobiálních a antioxidačních látek v kosmetice

Kosmetický průmysl se v poslední době snaží co nejvíce přizpůsobit potřebám spotřebitelů, kteří si stále častěji žádají nahrazení nebo omezení používaných chemických látek v produktech. Proto jsou tyto chemické složky nahrazovány či kombinovány s přírodními antimikrobiálními látkami s podobnými či stejnými účinky. Dochází tak k rozvoji výrobků bez konzervantů a tzv. sebezachovávací kosmetiky, kde jsou konzervační látky nahrazeny surovinami rostlinného původu [32].

V kosmetice jsou často využívány rostliny, které obsahují polyfenoly a flavonoidy, což jsou jedny z nejběžnějších látek s antimikrobiálními a antioxidačními účinky. Právě antioxidační aktivita je velmi ceněná. Volné radikály jsou totiž generovány ve všech živých buňkách. Avšak nadbytek těchto volných radikálů je zodpovědný za řadu onemocnění. Dalším projevem přebytku volných radikálů je stárnutí pleti, které je způsobováno tzv. oxidačním stresem. K prevenci proti oxidačnímu stresu, a tedy proti stárnutí, je možné využití přírodních antioxidantů, ty jsou proto přidávány do kosmetických výrobků. Také antimikrobiální aktivity polyfenolů a flavonoidů je využívána v řadě krémů s protizánětlivými účinky nebo v hojivých a zklidňujících krémech [33].

Vzrůstající zájem o přírodní kosmetické výrobky způsobil rovněž nárůst vědeckých prací zaměřených na porovnávání účinků chemických přípravků s přípravky přírodními. Příkladem takové práce je srovnání účinků rostlinných a chemických přípravků, které bylo provedeno na *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Rostlinné látky, extrakty a silice z heřmánku, měsíčku, aloe vera a levandule o koncentraci 2,5 %, byly srovnány s chemickou látkou - methylparaben o koncentraci 0,4 %. Z výsledků studie bylo zjištěno, že silice vykazovaly vyšší inhibiční aktivitu než extrakty a methylparaben. Všechny testované silice a extrakty navíc vykazovaly větší inhibiční účinek proti mikroorganismům než methylparaben. Výsledky tak ukázaly, že je možné nahradit methylparaben silicemi a extrakty, toto nahrazení zároveň zaručuje mikrobiologickou čistotu kosmetiky během používání a skladování [32].

Jiná studie se zabývala testováním krémů, které obsahovaly rostlinné extrakty, například z kořene lékořice (*Glycyrrhiza glabra*), listů pepřovníku (*Piper betle*) a indického šeríku (*Azadirachta indica*). Během testů byla potvrzena jejich antimikrobiální aktivita, bezpečnost při styku s kůží i stabilita při skladování [34].

2.8 Enkapsulace

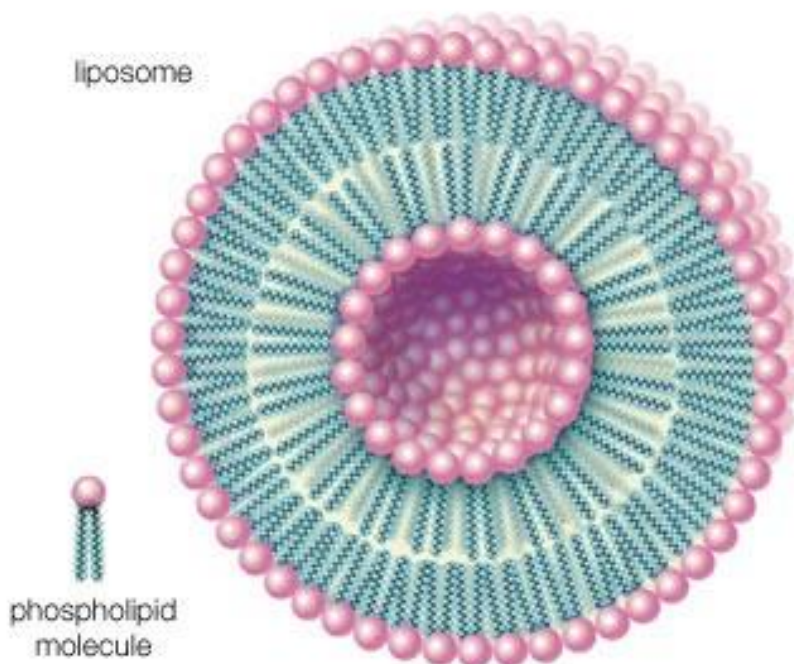
Enkapsulace, jiným názvem zapouzdření, je proces obalení aktivních látek do nosného materiálu. Enkapsulací dochází ke zlepšení transportu bioaktivních molekul na místo určení. Během enkapsulace se tvoří malé kapsule, které vytvářejí bariéry mezi vnitřním obsahem a okolním prostředím. Uvolnění obsahu nastává postupně za určitých podmínek [35].

Mezi důvody pro enkapsulaci patří ochrana aktivních látek před vnějším prostředím, snazší manipulace, kontrolované uvolňování a dávkování látek v místě určení, ochrana nestabilních látek před degradací, selektivní doručení, imobilizace mikroorganismu, stabilizace během výroby, skladování. Enkapsulaci je tak možné uplatnit v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [35].

2.8.1 Liposomy

Liposom je uměle vytvořený útvar, který obsahuje dutinu, jež je obklopena dvojvrstvou lipidické membrány. Membrána se skládá z fosfolipidů (lecithin) a cholesterolu. Princip tvorby liposomů je založen na základě hydrofilně-hydrofobních interakcí mezi fosfolipidy a vodou. Rozměry vznikajících částic jsou od 30 nm až do několika mm [35] [36].

Existuje řada způsobů přípravy liposomů, například pomocí ultrazvuku, odpařováním na tenké vrstvě, odpařováním na reverzní vrstvě, táním či metodou střídavého zmrazování a rozmazování [37].

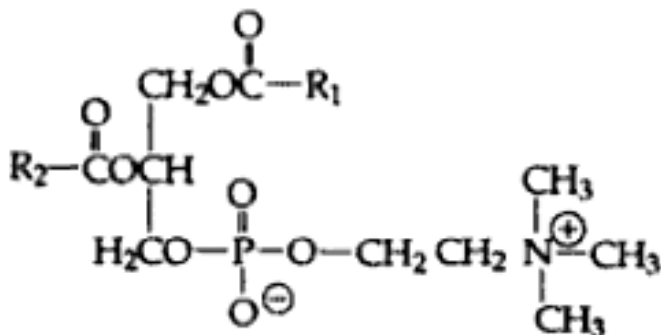


Obrázek 1: Struktura liposomu [38]

2.8.1.1 Lecithin

Lecithin nebo také fosfatidylcholin je triviální název pro 1,2-diacyl-glycero-3-fosfocholin. Jedná se o jednu z hlavních složek biologických membrán, tvoří 50 až 60 %, dále je to přírodní povrchově aktivní látka, která má řadu technologických využití. Můžeme se s ním setkat v gastronomii, pekařství, farmacii a kosmetice [39].

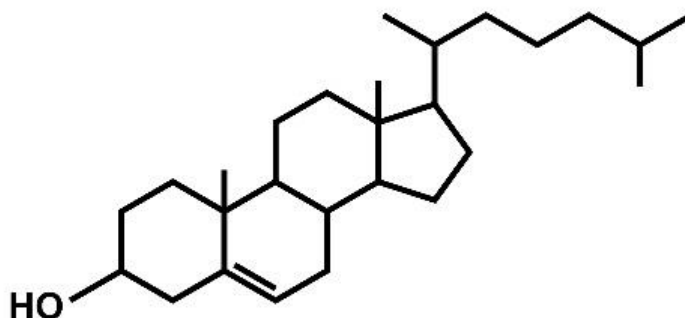
Lecithin je možné získat z živočišných i rostlinných zdrojů. Hlavním živočišným zdrojem je vaječný žloutek, ze kterého se lecithin získává cíleným srážením polárními rozpouštědly. Mezi rostlinné zdroje pak patří především sója, ale i slunečnice a řepka [39].



Obrázek 2: Lecithin [39]

2.8.1.2 Cholesterol

Cholesterol patří do skupiny steroidů a je důležitou složkou buněčných membrán. Jedná se o metabolický prekurzor steroidních hormonů, který se nachází například ve vaječném žloutku, svalovině, mozku a mléku. Během enkapsulace se vmezuje do fosfolipidové dvojvrstvy a napomáhá stabilizaci liposomu a ovlivňuje fluiditu membrány [40].



Obrázek 3: Cholesterol [41]

2.8.2 Metody přípravy liposomů

Liposomy je možné připravit více způsoby. Většina technik má však společný princip. Během procesu dochází k vytvoření kapiček aktivní látky a tyto kapičky jsou poté obaleny nosičem. Výběrem techniky lze ovlivnit následné vlastnosti připravených liposomů [35] [36].

2.8.2.1 Ultrazvuková metoda

Příprava liposomů pomocí ultrazvuku může probíhat dvěma postupy. První možností je sonifikace liposomů v sonifikační vodní lázni. Druhou možností je použití sonifikační sondy, tato metoda je vhodná pro malé objemy. Obě metody vedou k přípravě unilamelárních liposomů [42] [43].

2.8.2.2 Odpařování na tenké vrstvě

Tato metoda využívá vakuového odpaření organického rozpouštědla z varné baňky. Jakmile dojde k odpaření rozpouštědla, na stěnách baňky zůstane fosfolipidový film, který se následně hydratuje ve vodném prostředí. Pomocí třepání se film ze stěn přemění na multilamelární částice. Aby bylo dosaženo co nejlepších účinků, především u enkapsulace hydrofobních látek, film se připravuje již v přítomnosti látky, jež chceme enkapsulovat [43].

2.8.3 Aplikace liposomů v kosmetice

Použití liposomů jako nosičů aktivních látek skýtá řadu výhod. Například schopnost liposomů hydratace, napomáhá proti suchosti pokožky, což je jednou z hlavních příčin jejího stárnutí. To je také důvodem, proč velké množství krémů proti stárnutí obsahuje právě liposomy. Mezi další kosmetické přípravky, které využívají vlastnosti liposomů, jsou liposomové pasty, tyto přípravky obsahují aktivní látky, zvlhčující látky a extrakty vhodné pro aplikaci na spáleniny od slunce a jiná povrchová poranění. K dostání jsou například i opalovací krémy, vlasové kondicionéry či přípravky po holení s obsahem liposomů [44].

2.9 Metody charakterizace připravených částic

Z důvodů další aplikace připravených liposomů je nutná jejich charakterizace. Základní charakterizace udává informaci o enkapsulační účinnosti, stabilitě a velikosti částic [45] [46].

2.9.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Aktivní látka může být inkorporována ve vnitřím prostoru liposomů nebo v jeho fosfolipidové dvojvrstvě. Množství aktivní látky, které bylo začleněno do liposomů, ve srovnání s původním množstvím aktivní látky, bývá označováno jako enkapsulační účinnost. Běžně se udává v procentech a pro její určení je nutné stanovit, jaká koncentrace aktivní látky zůstala v okolním roztoku [45].

Existuje řada metod sloužících ke stanovení enkapsulační účinnosti, konkrétně UV-VIS spektrofotometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo titrační stanovení [45].

2.9.1.1 UV-VIS spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie se řadí mezi optické metody, které jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s analytem. Rozmezí používaného záření se pohybuje od UV oblasti (200-400 nm) do oblasti viditelného záření (400-800 nm). Kvantitativní stanovení jsou založena na Lamber-Beerově zákoně [45].

Spektrofotometrii je možné použít jako samostatnou metodu, ale je i velmi často používána jako detektor po separaci pomocí chromatografie [45].

2.9.2 Stanovení stability částic

Zeta potenciál je měřen pomocí laserové Dopplerovy elektroforézy, což je kombinace laserové Dopplerovy velocimetrie a elektroforézy. Touto metodou je určena rychlost, kterou se částice v kapalině pohybuje v elektrickém poli. Při známé velikosti použitého elektrického pole a po zjištění rychlosti pohybu částic, je možné vypočítat zeta potenciál pomocí dvou známých konstant vzorku (dielektrická konstanta, viskozita). Zeta potenciál je značně závislý na pH. Systém je nejméně stabilní v isoelektrickém bodě, tedy při hodnotě pH, kdy je náboj částice neutrální [46].

Velikost zeta potenciálu podává informaci o potenciální stabilitě koloidního systému. V případě, kdy mají všechny částice systému značný pozitivní nebo negativní zeta potenciál, dochází k vzájemnému odpuzování částic a nedochází k jejich shlukování. V opačném případě, při nízkém zeta potenciálu se částice neodpužují a dochází k flokulaci [46].

Za obecné hranice hodnot zeta potenciálu se považují -30 mV a 30 mV. Částice se zeta potenciálem mezi hraničními hodnotami jsou považovány za nestabilní [46].

2.9.3 Stanovení velikosti částic

Velikost částic je stanovována pomocí dynamického rozptylu světla. Dynamický rozptyl světla, jiným označením PCS (fotonová korelační spektroskopie) měří Brownův pohyb, ze kterého je možné určit velikost částic. Pojem Brownův pohyb označuje neuspořádaný pohyb částic v roztoku, mezi nimiž dochází ke vzájemným srážkám. Jakou rychlostí se částice pohybují, je závislé na jejich velikosti, velké částice se pohybují pomaleji a malé naopak rychleji [46].

Jelikož se částice pohybují neustále, můžeme pomocí dvou krátce po sobě jdoucích snímků určit vzdálenost, o kterou se daná částice posunula a z této informace zjistit její velikost. Při měření dynamického rozptylu světla jsou částice v roztoku osvětleny laserem, odchylky intenzity rozptylu světla jsou následně analyzovány a je stanovena velikost částic [46].

2.10 Kultivace mikroorganismů

Kultivace neboli pěstování mikroorganismů je základem mikrobiologické práce. Hlavním faktorem ovlivňujícím úspěšnost kultivace je volba správného živného (kultivačního) média. Dále je nutné zvolit vhodnou teplotu a přístup vzduchu s ohledem na pěstované mikroorganismy [47].

Živná média je možné dělit podle:

- původu (přírodní, syntetická, umělá);
- skupenství (pevná, polotuhá, tekutá);
- obsahu živin (základní, obohacená, limitovaná);
- účelu použití (selektivní, univerzální, diagnostická, výběrová-diagnostická).

I když je živných médií celá řada, všechny spojuje všeobecné složení, a to zdroj uhlíku, dusíku a minerálních látek, voda, selektivní činidla, látky upravující pH a stužovadlo (agar, želatina). Nejčastěji užívaným stužovadlem je agar, což je polysacharid získávaný z mořských řas. Agar je tekutý při 96 °C a tuhne při 40 °C, těchto vlastností se využívá při sterilizaci [47]. Tuhá média se kultivují v termostatu s výměnou vzduchu a misky se uchovávají agarem vzhůru, protože dochází ke kondenzaci vody. Kapalná média se kultivují v termostátované třepačce, kdy třepání zajišťuje vhodný přísun kyslíku kultivovanému kmeni. Mikroorganismy se obvykle kultivují několik dní [47].

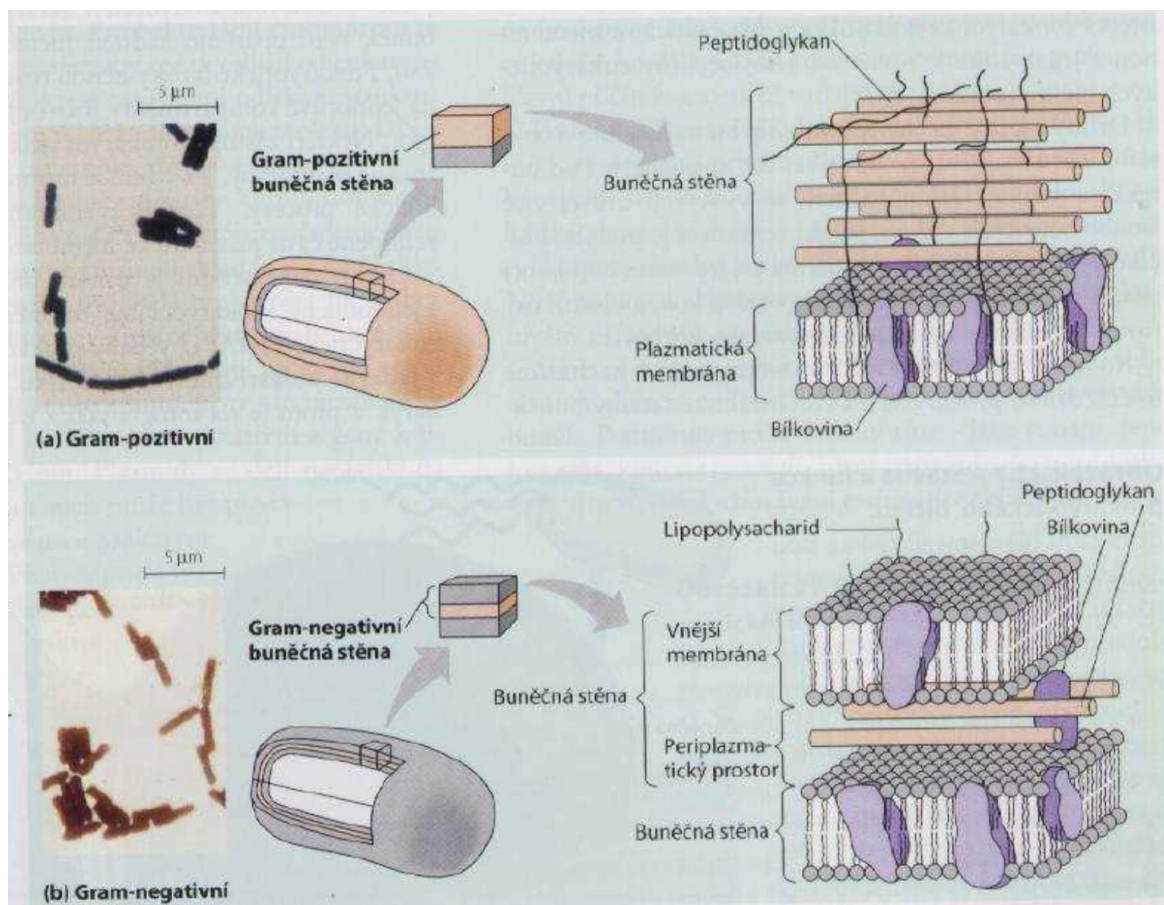
2.11 Použité mikroorganismy

Za účelem stanovení antimikrobiální aktivity vybraných rostlin byly k testování vybrány dva druhy bakterií, jeden druh ze skupiny grampozitivních bakterií, druhý druh ze skupiny gramnegativních bakterií [48].

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy s prokaryotickým typem buňky. Bakterie se vyznačují rozmanitou morfologií, nejrozšířenější jsou bakterie tyčinkového tvaru, dále bakterie kulovitého tvaru (koky) a bakterie vláknitého tvaru. Jejich velikost se řádově udává v mikrometrech. U bakterií se můžeme setkat se všemi známými možnostmi získávání energie a zdroji uhlíku, existují bakterie chemoheterotrofní, chemoautotrofní, fotoheterotrofní i fotoautotrofní. Dále se vyznačují specifickým metabolismem, ten umožňuje jejich rozmnožování a rychlý růst [48] [49] [50].

Velký význam pro bakteriální buňku má její buněčná stěna. Mezi její hlavní funkce patří ochrana před mechanickým či chemickým poškozením. Dále brání vysychání, má na starosti udržování tvaru buňky a stálého osmotického tlaku v buňce. Z důvodů velké rozmanitosti bakterií je i struktura buněčné stěny různá. Stavební látkou buněčné stěny je peptidoglykan (murein), mezi jeho molekuly můžou být vnořeny lipidy, bílkoviny, polysacharidy a další látky [48] [49] [50].

Nejčastějším dělením bakterií podle struktury buněčné stěny je na grampozitivní a gramnegativní bakterie. K jejich rozlišení se využívá Gramova diagnostického barvení. Během stanovení se na tepelně fixované buňky bakterií působí krystalovou violetí a roztokem jodu. Následně se obarvené buňky opláchnou organickým rozpouštědlem (ethanol, aceton). Výsledkem jsou fialově obarvené grampozitivní bakterie a odbarvené gramnegativní bakterie, které se dále dobarvují kontrastní barvou [48] [49] [50]. Struktura buněčných stěn a Gramovo barvení grampozitivních a gramnegativních bakterií je znázorněno na obrázku 4 [51].



Obrázek 4: Struktura buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií [51]

2.11.1 Gramnegativní mikroorganismy

U gramnegativních bakterií je buněčná stěna složená z tenké vrstvy peptidoglykanů, která neobsahuje kyselinu teichoovou a z vnější membrány, ta obsahuje fosfolipidy, lipoproteiny, strukturní a enzymové proteiny [52].

2.11.1.1 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je bakterie z rodu *Enterobakterie*. Jedná se o fakultativně anaerobní, chemotrofní, pohyblivou bakterii, má tyčinkovitý tvar a patří do skupiny gramnegativních bakterií, která netvoří spory. Tato bakterie se vyznačuje produkcí červeného pigmentu prodigiosinu [53] [54].

Je to původce onemocnění u pacientů s oslabenou imunitou a drogově závislých jedinců. Může způsobovat infekce dýchacích cest, infekci ran a urogenitálního traktu, sepsi, meningitidu a endokarditidu [53] [54].

2.11.2 Grampozitivní mikroorganismy

Stěna grampozitivních bakterií je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanů, tato vrstva je vyplněna kyselinou teichoovou. Právě přítomnost kyseliny teichoové v buněčné stěně způsobuje fixaci fialového zbarvení při Gramově metodě [52].

2.11.2.1 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus patří do čeledi *Micrococcaceae*. Tato bakterie je aerobní, grampozitivní, má kulovitý tvar a může se vyskytovat ve shlucích nebo párech, nemá bičíky a netvoří spory. Produkuje barvivo lutein, které je žluté barvy a řadí se do skupiny karotenoidních barviv [55] [56].

Jedná se o velmi rozšířený druh, který je všeobecně považován za neškodný a je možné ho najít na kůži a sliznicích ústní dutiny a dýchacích cest. U jedinců s oslabenou imunitou ovšem může vyvolat různé infekce [55] [56].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je testování přírodních antibakteriálních látek jako alternativy k antibiotikům, a to zejména pro kosmetické účely a zevní aplikaci. V rámci této práce byly plněny následující úkoly:

1. Příprava vybraných rostlinných extraktů
2. Analýza hlavních obsahových látek
3. Enkapsulace aktivních extraktů do organických částic
4. Testování antimikrobiálního účinku

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DE)

Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DE)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)

Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)

Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS - Malvern (UK)

ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)

Ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonoplus HS3200 - Sonorex Technik (DE)

Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)

Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)

Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (DE)

Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)

Optický mikroskop a software Dino Capture (ČR)

Biohazard box, model Airstream, třída II -ESCO, Biotech (ČR)

Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (DE) a Biohit (DE)

4.1.2 Použité chemikálie

Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)

Agar Powder, Himedia (India)

Nutrient Broth (NB), Himedia (India)

Ethanol pro UV/VIS 99% - Lach-Ner (ČR)

Chloroform – Lach-Ner (ČR)

Methanol – Lach-Ner (ČR)

Lecithin ze sóje - Serva (DE)

Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu - Serva (DE)

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina)-(ABTS) - Sigma-Aldrich (DE)

Uhličitan sodný – Lach-Ner (ČR)

Hydroxid sodný – Lach-Ner (ČR)

Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (DE)

Chlorid hlinitý – Lach-Ner (ČR)

Dusitan sodný – Lach-Ner (ČR)

Katechin - Sigma-Aldrich (DE)

Bezvodý síran sodný – Lach-Ner (ČR)

Carbomer, Polygel CA, Miča a Harašta, s.r.o (ČR)

4.2 Použité mikroorganismy

V experimentální části této práce byly používány na testování antimikrobiální aktivity kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Serratia marcescens* CCM 8587. Obě použité bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.3 Použité byliny a koření

Badyán (Vitana), dubová kůra (Leros), hřebíček celý (Avokádo), kozinec (Valdemar Grešík – Natura s.r.o.), lapacho (Léčivé rostliny), lichořeřišnice (Léčové rostliny), muškátový oříšek (Avokádo), oregáno (Avokádo), pepř černý (Nadir), pomerančová kůra (Valdemar Grešík – Natura s.r.o.), skořice celá/mletá (Kotányi, Nadir), zázvor mletý (Avokádo).

4.4 Příprava extraktů

Celkem byly připraveny tři druhy extraktů, kontrétně vodné, alkoholové a olejové. Vodné extrakty byly navíc připraveny ve dvou koncentracích (0,1 a 0,01 g/ml).

4.4.1 Příprava vodných extraktů

K přípravě vodných extraktů bylo použito 0,1 g a 1 g rostlinné látky. Navážka byla louhována v 10 ml vroucí vody po dobu 15 minut. Poté byly vzniklé extrakty zfiltrovány.

4.4.2 Příprava alkoholových extraktů

Alkoholové extrakty byly připraveny z 1 g rostlinné látky. Navážka byla louhována v 10 ml methanolu po dobu 72 hodin na třepačce při 30 °C. Alkoholové extrakty byly následně zfiltrovány a odpařeny na vakuové rotační odparce, vzniklý film byl rozpuštěn ve směsi ethanol a voda v poměr 1:1.

4.4.3 Příprava olejových extraktů

Olejové extrakty byly připraveny metodou dle Folche. Bylo naváženo 10 g rostlinné látky, ta byla extrahována v 200 ml extrakční směsi složené z chloroformu a methanolu v poměru 2 : 1. Extrakce probíhala při laboratorní teplotě, 60 minut za stálého míchání na magnetické míchačce. Poté byla směs zfiltrována přes skládaný filtr, vzorek z filtru byl převeden do kádinky, kde byl smíchán se 100 ml extrakční směsi a po dobu 30 minut opět při laboratorní teplotě míchán na míchačce a následně zfiltrován. Extrakty z obou frakcí byly smíseny a bylo přidáno 360 ml destilované vody (1,2-násobek). V nádobě došlo k ustálení dvou fází. Vrchní vodná fáze byla oddělena a spodní chloroformová fáze byla přefiltrována přes bezvodý síran sodný do předem zvážené varné baňky s kulatým dnem. Obsah baňky byl poté odpařen na vakuové rotační odparce při 40 °C. Po odpaření byla baňka opět zvážena. Vyextrahované oleje byly rozpuštěny v malém množství chloroformu a uschovány v tmavých skleněných lahvičkách. Před dalším použitím byl ze vzorků odpařen chloroform.

4.5 Charakterizace extraktů

4.5.1 Stanovení celkové koncentrace polyfenolů

Celková koncentrace polyfenolů se stanovuje spektrofotometricky, kdy je určena intenzita zabarvení vzorku, který reaguje s Follin-Ciocaltauvým činidlem. Jako standard je používána kyselina gallová.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml Follin-Ciocaltautova činidla, které bylo zředěno vodou v poměru 1 : 9, byl přidán 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Obsah zkumavky byl promíchán a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po promíchání byl vzorek ponechán 15 minut stát, poté byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku, kde byla místo vzorku přidána voda.

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit stejný postup. Jako standard byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové o koncentraci v rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml. Ze získaných dat byl sestrojen graf kalibrační závislosti.

4.5.2 Stanovení celkové koncentrace flavonoidů

Koncentrace flavonoidů se určuje spektrofotometricky, je dána změnou zbarvení a intenzitou absorbance. Jako standard se používá 1M roztok katechinu v ethanolu.

Do zkumavky s 0,5 ml vzorku bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO_2 . Obsah byl promíchán a ponechán 5 minut stát. Bylo přidáno 0,2 ml 10% AlCl_3 , obsah byl promíchán a ponechán 5 minut stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml NaOH o koncentraci 1 mol/dm^3 a 1 ml destilované vody, po promíchání byl obsah ponechán stát 15 minut. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti destilované vodě.

Pro kalibraci byla připravena kalibrační řada roztoku katechinu o koncentraci v rozmezí od 0,05 do 0,3 mg/ml. Naměřené hodnoty byly zpracovány do grafu kalibrační závislosti.

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Pro určení antioxidační aktivity extraktů byla použita metoda, která využívá činidlo $\text{ABTS}^{\bullet+}$. ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě tak, aby měl připravený roztok koncentraci 7 mM. Pro vytvoření radikálového kationtu byl roztok smíchán s peroxodisíranem draselným (2,45 mM) a byl ponechán stát 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Před použitím $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo třeba roztok naředit UV-VIS ethanolem na absorbanci $0,700 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm oproti ethanolu.

Měření bylo prováděno v zúžené kyvetě, do které byl napipetován 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a bylo přidáno 10 μl vzorku. Pokles absorbance byl měřen v desáté minutě po přidání vzorku (A_{10}). Jako blank bylo použito 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s 10 μl vody nebo ethanolu (A_0), za pomoci této hodnoty byl určen pokles absorbance.

Pro kalibraci je jako standard používán roztok Troloxu rozpuštěný v 60% ethanolu o koncentraci v rozmezí od 50 do 400 ng/ml. Pro výpočet z rovnice byla dosazována hodnota ΔA ($A_0 - A_{10}$) a výsledná hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu [57].

4.6 Příprava liposomů

Ze všech typů testovaných extraktů byly připraveny liposomy a to pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru.

4.6.1 Příprava liposomů z vodných extraktů

Vodné extrakty z testovaných vzorků (10 ml) byly přidány do kádinky k 180 mg lecithinu a 20 mg cholesterolu. Směs byla pomocí tyčového ultrazvuku intenzivně míchána minimálně 1 minutu do vzniku liposomů.

4.6.2 Příprava liposomů z alkoholových extraktů

Alkoholové extrakty v 50% ethanolu byly nejprve naředeny na 10% roztok destilovanou vodou. K 10 ml tohoto roztoku bylo přidáno 180 mg lecithinu a 20 mg cholesterolu. Za použití tyčového ultrazvuku byla směs míchána po dobu 1 minuty za vzniku liposomů.

4.6.3 Příprava liposomů z olejových extraktů

Do Eppendorfovy zkumavky bylo naváženo malé množství olejového extraktu, navážka oleje byla zapsána, dále bylo přidáno 160 mg lecithinu, 20 mg cholesterolu a 1 ml chloroformu. Směs byla důkladně promíchána. Obsah zkumavky byl poté nalit do kádinky s 10 ml destilované vody a vzniklá směs byla pomocí ultrazvuku míchána minimálně 1 minutu do vzniku liposomů. Poté byl zbytkový chloroform při 50 °C odpařen na magnetické míchačce s ohřevem.

4.7 Charakterizace připravených liposomů

U připravených liposomů byla ihned po jejich výrobě ustanovena jejich enkapsulační účinnost. Dále byla u liposomů zkoumána jejich velikost a stabilita. Na závěr byla testována dlouhodobá stabilita liposomů při skladování při 5 °C po dobu 1 měsíce.

4.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Ihned po přípravě byl roztok liposomů zcentrifugován při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Po stočení byla v supernatantu stanovena koncentrace volných polyfenolů, stejným postupem jako byla stanovena celková koncentrace polyfenolů v roztoku před enkapsulací. Z rozdílu koncentrace polyfenolů v roztoku před a po enkapsulaci byla následně stanovena enkapsulační účinnosti.

4.7.2 Stanovení dlouhodobé stability liposomů

Připravené liposomy byly skladovány ve vodném prostředí při teplotě 5 °C. Po měsíci od přípravy byly částice centrifugovány 60 minut při 11 000 ot/min. Poté byl supernatant důkladně oddělen a usazené liposomy byly usušeny při laboratorní teplotě. K suchým liposomům byl přidán 1 ml chloroformu a částice byly rozpuštěny. Následně byla ve vzorku stanovena koncentrace enkapsulovaných polyfenolů. Do suché zkumavky bylo napipetováno 50 µl připraveného vzorku, poté byl odpařen chloroform. Dále byl postup shodný se stanovením celkových polyfenolů dle postupu uvedeném v kapitole 4.5.1.

4.7.3 Stanovení stability a velikosti liposomů

Distribuce částic a jejich velikost jsou jedny z nejdůležitějších parametrů pro hodnocení fyzikální stability nanočástic a dynamický rozptyl světla (DLS) je jednou z běžně používaných technik pro měření velikosti částic. DLS metoda je používána k určení distribuce velikostí nanočástic v kapalném médiu. V této práci byly liposomy analyzovány na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS, který nám umožnil proměřit základní data jako distribuce velikosti částic, průměrná velikost částic a index polydisperzity. Pomocí nástavce s elektrodou byl změřen rovněž zeta potenciál (ZP), na základě kterého byla přímo zjištěna stabilita částic. Obecně platí, že absolutní hodnota zeta potenciálu větší než 60 mV indikuje vynikající stabilitu částic, hodnota 30 mV obecně udává dobrou stabilitou, méně než 5 mV naopak indikuje velmi rychlou agregaci a nestabilitu nanočástic.

4.8 Kultivace mikroorganismů

Ke kultivaci byl použit bakteriální kmen *Micrococcus luteus* ze skupiny grampozitivních bakterií a bakteriální kmen *Serratia marcescens*, který patří do skupiny gramnegativních bakterií. Práce s těmito bakteriemi byla prováděna ve sterilním boxu a kultury byly očkované na tuhá i kapalná media. Inkubace byla prováděna na třepáčkách při 37 °C.

Před kultivací bakterií byla média vždy sterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 60 minut.

4.8.1 Příprava médií

Na přípravu kapalných médií bylo používáno médium Nutrient Broth (NB), bylo postupováno podle pokynů výrobce. Na přípravu 100 ml kapalného média tak bylo naváženo 2,5 g NB média.

Při přípravě tuhého média byl navíc k navážce NB média přidán agar. Na přípravu 100 ml tuhého média bylo naváženo 2,5 g NB média a 2 g agaru. Po sterilizaci bylo ještě za horka tuhé médium rozlito do Petriho misek.

4.9 Antimikrobiální testy

Připravené extrakty a liposomy byly vždy testovány na obou bakteriálních kmenech. Byly prováděny dva typy antimikrobiálních testů – diluční metoda a difúzní metoda. Práce byla prováděna ve sterilním boxu.

4.9.1 Bujónová diluční metoda

Tato metoda byla založena na sledování růstu mikroorganismů na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Přesněji byla sledována vzrůstající absorpance při 630 nm vyjadřující růst mikroorganismů.

K testování byly použity bakteriální buňky z 24 hodinové kultivace, buňky byly před použitím desetkrát zředěny sterilním NB médiem (absorpance při 630 nm byla 0,1). Zředěné buňky byly napipetovány po 150 μ l do každé jamky. K buňkám bylo dále přidáno 50 μ l antimikrobiální látky (extraktu, liposomů). Jako blank byla používána kultura s přídavkem 50 μ l vody, případně jiného použitého rozpouštědla. Růst bakterií respektive absorpance byla měřena v čase 0 a po 24 hodinách kultivace.

4.9.1.1 Příprava vzorků

Jako antimikrobiální látky byly používány roztoky rostlinných extraktů nebo liposomy. Testované liposomy (1 ml) byly po přípravě centrifugovány po dobu 60 minut při 11 000 ot/min. Poté byl supernatant pečlivě oddělen. Sediment liposomů byl rozsuspendován v 1 ml sterilní destilované vody. Následně byl vzorek použit k analýze.

4.9.2 Agarová difúzní metoda

Na Petriho misky s tuhým agarem byla naočkována 24 hodinová kultura bakteriálních buněk. Na agarovou plotnu bylo napipetováno vždy 100 μ l buněk v médiu, které byly rozetřeny sterilní hokejkou. Misky byly následně ponechány stát po dobu 20 minut. Na závěr byly na připravený povrch nanášeny tuhé lipidové extrakty.

Vyhodnocení bylo provedeno po 24 hodinách kultivace, kdy byly pozorovány vzniklé inhibiční zóny kolem pevných extraktů.

4.10 Příprava gelu s antimikrobiální látkou

Gely byly připravovány z destilované vody a carbomeru o koncentraci 1 %. Do kádinky s destilovanou vodou byl přidáván carbomer a míchán do vzniku gelu. V případě gelu s obsahem liposomů bylo navíc dodáno 10 % příslušných liposomů rozsuspendovaných ve vodě. Směs byla vždy důkladně promíchána, na závěr byla u připravených gelů zkoumána barva a vůně.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na studium antimikrobiálních vlastností vybraných rostlinných materiálů. K analýze bylo vybráno celkem 12 druhů bylin a koření. Z každého vzorku byly připraveny tři typy extraktů – vodné, alkoholové a olejové. Testovány tedy byly extrakty z badyánu, dubové kůry, hřebíčku, kozince, lapacha, lichořeřišnice, muškátového oříšku, oregána, pepře, pomerančové kůry, skořice a zázvoru.

U připravených extraktů byl sledován obsah aktivních látek a antioxidační aktivita. Z takto charakterizovaných extraktů byly následně připraveny liposomy, u nichž byla určena velikost, stabilita, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita.

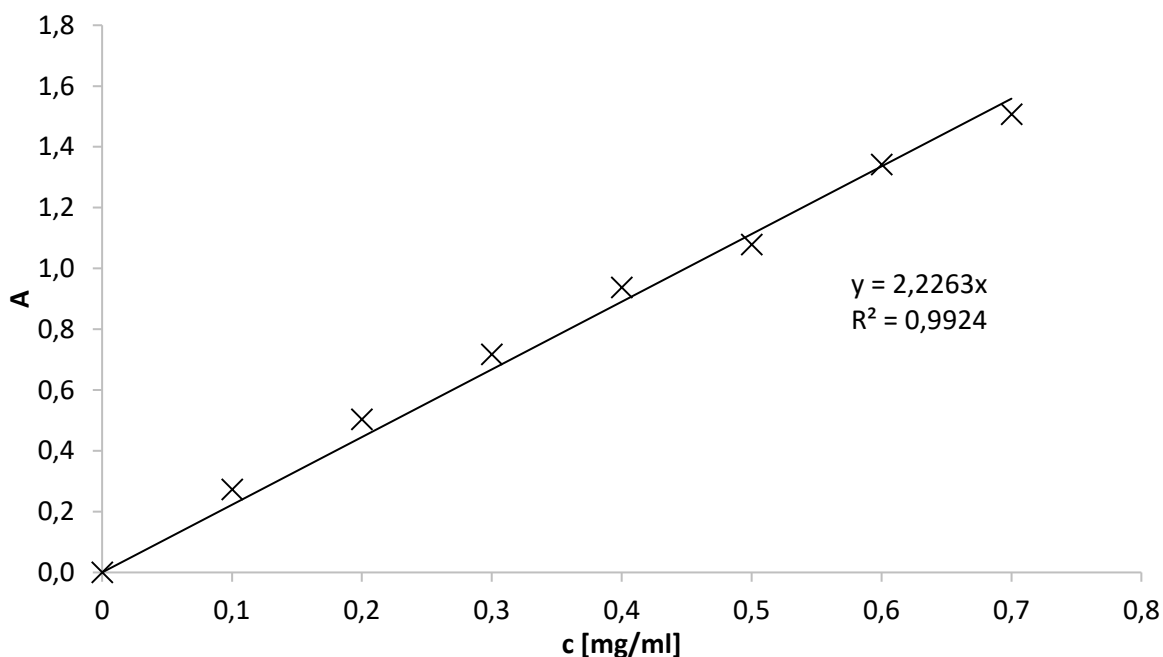
Na závěr byly provedeny antimikrobiální testy vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriálním kmenům, přičemž byla zkoumána antimikrobiální aktivita extraktů i liposomů.

5.1 Charakterizace extraktů

Vodné, alkoholové a olejové extrakty byly z jednotlivých druhů bylin a koření připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.4. U testovaných extraktů byla provedena základní charakteristika, byla stanovena celková koncentrace polyfenolů a celková koncentrace flavonoidů, dále byla sledována antioxidační aktivita extraktů.

5.1.1 Stanovení celkové koncentrace polyfenolů

Při určování celkové koncentrace polyfenolů byla nejdříve sestavena kalibrační závislost, podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1.

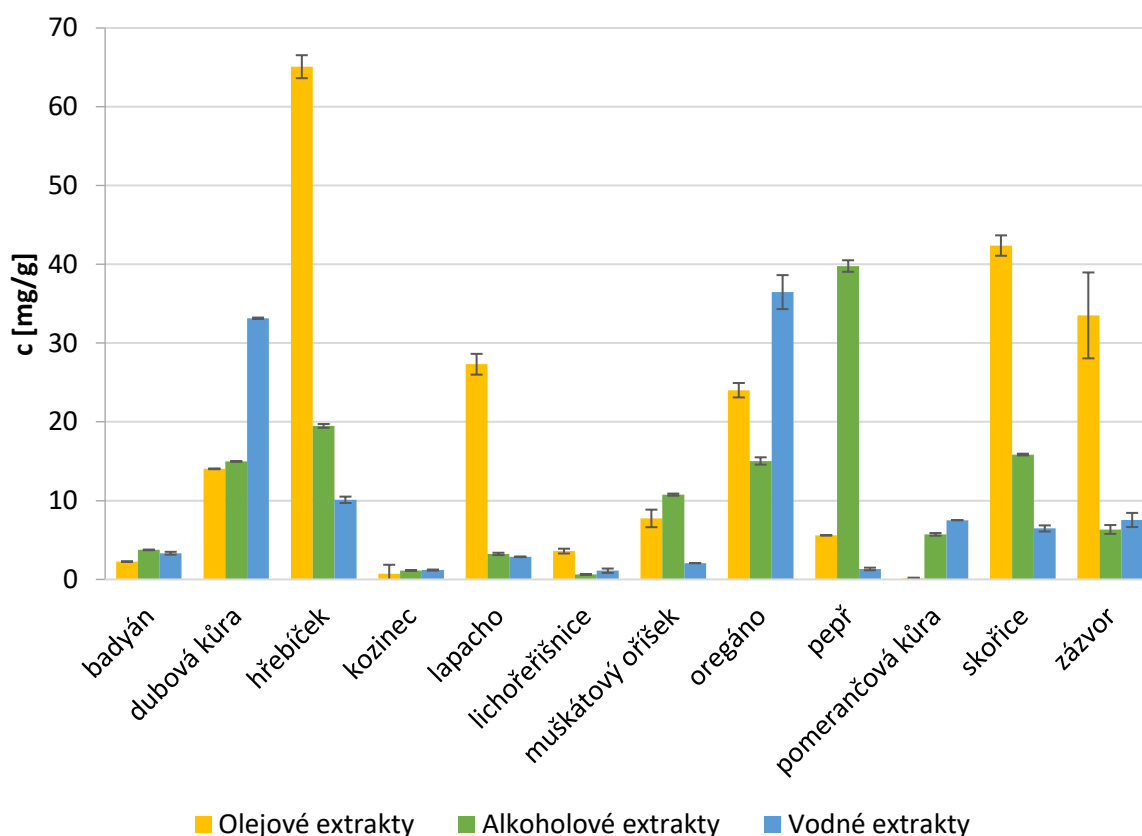


Obrázek 5: Kalibrační závislost pro stanovení celkových polyfenolů

Celková koncentrace polyfenolů v extraktech byla stanovena spektrofotometricky a vypočítána z lineární regrese kalibrační závislosti. Každý extrakt byl měřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace byla přepočítána na miligramy polyfenolů na gram rostliny. V tabulce 2 jsou uvedeny získané výsledky koncentrací polyfenolů v extraktech z vybraných rostlinách.

Tabulka 2: Výsledné celkové koncentrace polyfenolů v extraktech

	Oleјové extrakty	Alkoholové extrakty	Vodné extrakty
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
badyán	2,26 ± 0,01	3,75 ± 0,04	3,32 ± 0,18
dubová kůra	14,04 ± 0,05	14,98 ± 0,02	33,15 ± 0,09
hřebíček	65,08 ± 1,46	19,49 ± 0,24	10,11 ± 0,40
kozinec	0,71 ± 1,15	1,14 ± 0,02	1,19 ± 0,07
lapacho	27,31 ± 1,32	3,24 ± 0,15	2,87 ± 0,03
ličořeřišnice	3,60 ± 0,30	0,63 ± 0,00	1,11 ± 0,28
muškátový oříšek	7,75 ± 1,11	10,76 ± 0,13	2,07 ± 0,00
oregáno	24,02 ± 0,92	15,04 ± 0,46	36,47 ± 2,16
pepř	5,60 ± 0,03	39,78 ± 0,73	1,33 ± 0,17
pomerančová kůra	0,16 ± 0,06	5,72 ± 0,17	7,52 ± 0,02
skořice	42,38 ± 1,29	15,85 ± 0,11	6,47 ± 0,39
zázvor	33,52 ± 5,45	6,34 ± 0,56	7,55 ± 0,90



Obrázek 6: Obsah polyfenolů v extraktech

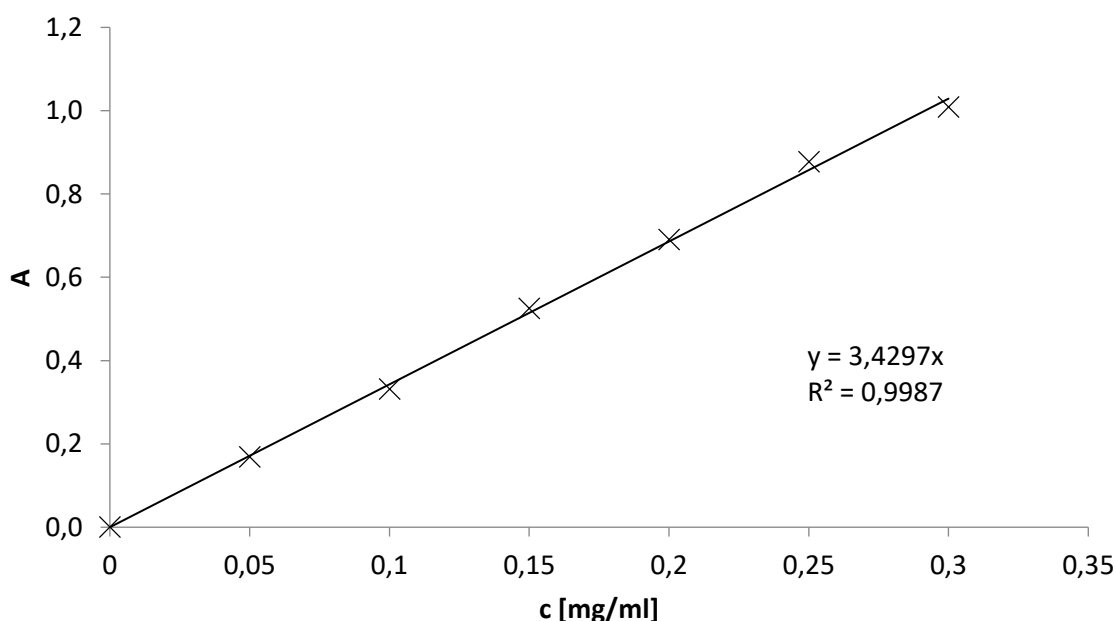
Z dosažených výsledků (obrázek 6) je patrné, že extrakty z badyánu všeobecně neobsahují velké množství polyfenolů stejně jako extrakty z ličořeřišnice, muškátového oříšku, pomerančové kůry a kozince, u něhož byl zaznamenán nejnižší obsah polyfenolů. U ostatních extraktů bylo stanoveno vyšší množství polyfenolů.

Z extraktů dubové kůry obsahoval nejvíce polyfenolů vodný extrakt. Naopak u hřebíčku bylo nejvíce polyfenolů stanoveno u olejového extraktu. Tento extrakt navíc obsahoval vzhledem ke všem připraveným extraktům největší množství polyfenolů (65,08 mg/g). Z extraktů lapacha obsahoval nejvíce polyfenolů olejový extrakt. U oregána obsahovaly vysoké množství polyfenolů všechny testované extrakty, nejvíce jich však obsahoval vodný extrakt. Vodný extrakt oregána obsahoval nejvyšší koncentraci polyfenolů ze všech vodných extraktů a to 36,47 mg/g. Olejový a vodný extrakt pepře naopak obsahovaly malou koncentraci polyfenoly, avšak alkoholový extrakt obsahoval 39,78 mg/g polyfenolů, což je nejvyšší obsah ze všech připravených alkoholových extraktů. U extraktů ze skořice a zázvoru pak obsahovaly nejvíce polyfenolů jejich olejové extrakty.

Obecně není z grafu patrný žádný výrazný trend, u různých testovaných typů extrakce bylo u jednotlivých vzorků zaznamenáno různé množství v zastoupení polyfenolů, obsah polyfenolů byl tak v jednotlivých extraktech zcela individuální u každé z vybraných rostlin.

5.2 Stanovení celkové koncentrace flavonoidů

Pro stanovení celkové koncentrace flavonoidů byla sestrojena kalibrační závislost podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.

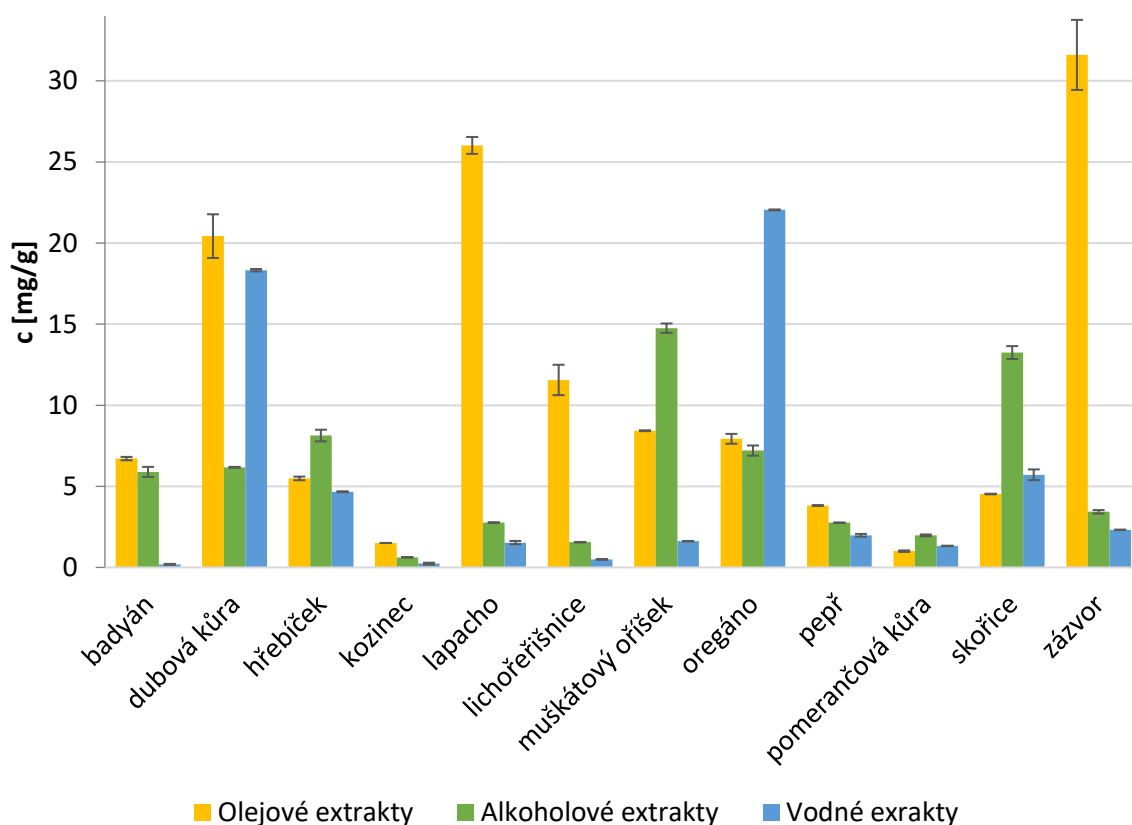


Obrázek 7: Kalibrační závislost pro stanovení celkových flavonoidů

Stejně jako u stanovení celkových polyfenolů byla celková koncentrace flavonoidů v extraktech stanovena spektrofotometricky a vypočítána z lineární regrese kalibrační závislosti. Každý extrakt byl měřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace byla přepočítána na miligramy flavonoidů na gram rostliny. V tabulce 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrací flavonoidů v extraktech z vybraných rostlinách.

Tabulka 3: Výsledné celkové koncentrace flavonoidů v extraktech

	Olejo v é extrakty	Alkoholové extrakty	Vodné extrakty
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
badyán	6,71 ± 0,11	5,89 ± 0,31	0,19 ± 0,03
dubová kůra	20,43 ± 1,35	6,17 ± 0,03	18,33 ± 0,07
hřebíček	5,49 ± 0,11	8,13 ± 0,36	4,67 ± 0,03
kozinec	1,51 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,23 ± 0,06
lapacho	26,02 ± 0,52	2,76 ± 0,01	1,53 ± 0,10
ličořeřišnice	11,56 ± 0,94	1,55 ± 0,02	0,49 ± 0,00
muškátový oříšek	8,43 ± 0,03	14,75 ± 0,29	1,62 ± 0,01
oregáno	7,93 ± 0,30	7,20 ± 0,31	22,04 ± 0,03
pepř	3,82 ± 0,02	2,76 ± 0,01	1,98 ± 0,09
pomerančová kůra	1,00 ± 0,05	1,98 ± 0,06	1,33 ± 0,01
skořice	4,53 ± 0,02	13,25 ± 0,40	5,71 ± 0,33
zázvor	31,60 ± 2,16	3,43 ± 0,11	2,32 ± 0,01



Obrázek 8: Obsah flavonoidů v extraktech

Z grafu (obrázek 8) je zřetelně vidět, že olejové a alkoholové extrakty z badyánu vykazovaly srovnatelný obsah flavonoidů (v průměru 6 mg/g), naopak vodný extrakt obsahoval pouze minimum flavonoidů. Extrakty z dubové kůry pak obsahovaly vyšší množství flavonoidů, hlavně v případě olejového a vodného extraktu (přibližně čtyřnásobek).

Obsah flavonoidů v extraktech z hřebíčku byl srovnatelný s badyánem, největší množství bylo stanoveno u jeho alkoholového extraktu (8,13 mg/g). Naopak ve všech extraktech z pepře,

pomerančové kůry a především z kozince byl zaznamenán výrazně nižší obsah flavonoidů. Z extraktů z lapacha obsahoval nejvyšší koncentraci flavonoidů olejový extrakt. Stejně tak tomu bylo i u extraktů z lichořeřišnice. Z extraktů z muškátového oříšku obsahoval nejvyšší koncentraci flavonoidů alkoholový extrakt, zároveň tento extrakt obsahoval nejvíce flavonoidů ze všech alkoholových extraktů, konkrétně 14,75 mg/g. V případě oregána obsahoval nejvyšší koncentraci flavonoidů vodný extrakt, který vykazoval nejvyšší obsah i ze všech vodných extraktů (22,04 mg/g). Ze skořicových extraktů měl nejvyšší množství flavonoidů alkoholový extrakt. Naopak alkoholový a vodný extrakt ze zázvoru obsahovaly relativně nízký obsah flavonoidů, ale olejový extrakt zázvoru obsahoval 31,60 mg/g, což je nejvyšší obsah flavonoidů nejen ze všech olejových extraktů, ale i ze všech připravených extraktů.

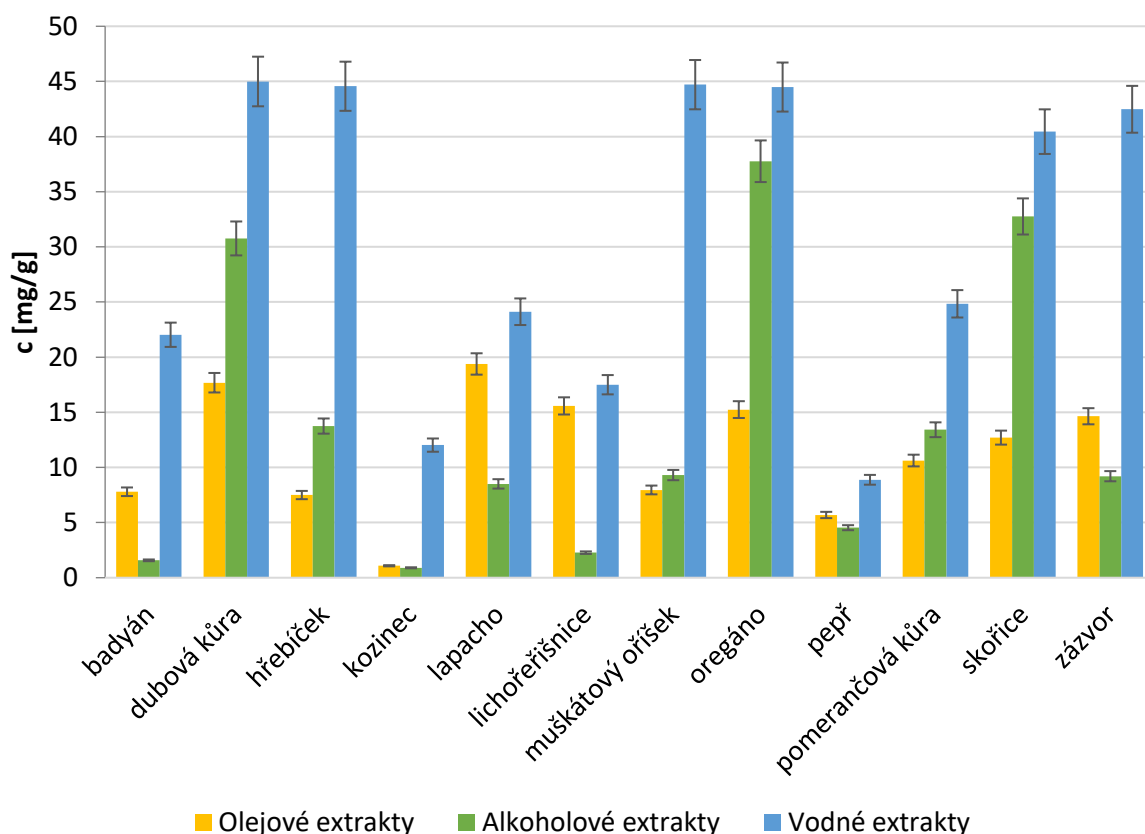
5.3 Stanovení antioxidační aktivity

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3 byla stanovena antioxidační aktivita u všech olejových, alkoholových a vodných extraktů. Výsledná antioxidační aktivita byla přepočítána na miligramy antioxidantů na gram rostliny. V tabulce 4 jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu antioxidantů v extraktech z vybraných rostlinách.

Tabulka 4: Výsledný obsah antioxidantů v extraktech

	Olejové extrakty	Alkoholové extrakty	Vodné extrakty
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
badyán	7,79 ± 0,39	1,57 ± 0,08	22,03 ± 1,10
dubová kůra	17,68 ± 0,88	30,76 ± 1,54	44,99 ± 2,25
hřebíček	7,50 ± 0,37	13,75 ± 0,69	44,56 ± 2,23
kozinec	1,08 ± 0,05	0,90 ± 0,04	12,02 ± 0,60
lapacho	19,38 ± 0,97	8,51 ± 0,43	24,12 ± 1,21
licheřeřišnice	15,58 ± 0,78	2,27 ± 0,11	17,50 ± 0,87
muškátový oříšek	7,96 ± 0,40	9,31 ± 0,47	44,70 ± 2,24
oregáno	15,24 ± 0,76	37,76 ± 1,89	44,49 ± 2,22
pepř	5,69 ± 0,28	4,54 ± 0,23	8,88 ± 0,44
pomerančová kůra	10,62 ± 0,53	13,42 ± 0,67	24,84 ± 1,24
skořice	12,70 ± 0,64	32,75 ± 1,64	40,44 ± 2,02
zázvor	14,64 ± 0,73	9,20 ± 0,46	42,47 ± 2,12

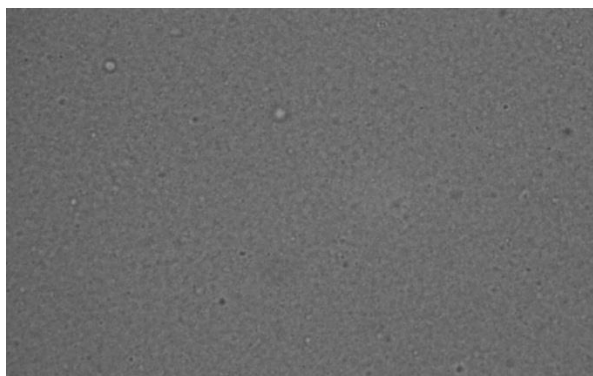
Z dosažených výsledků (obrázek 9) je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly obecně vodné extrakty. Z jednotlivých rostlin vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu dubová kůra. Dalšími velmi účinnými rostlinami byl hřebíček, muškátový oříšek, oregáno, skořice a zázvor. Nejnižší aktivita byla naopak zjištěna u pepře a kozince, u kterých byla rovněž zjištěna nízká koncentrace polyfenolů a flavonoidů.



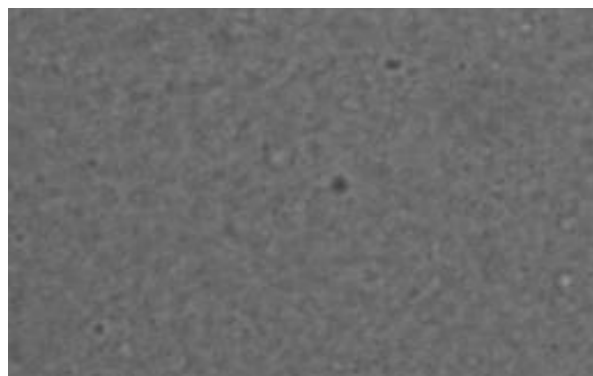
Obrázek 9: Antioxidační aktivita extraktů

5.4 Příprava částic

Podle postupu, který je uveden v kapitole 4.6, byly připraveny liposomové částice. Liposomy byly připraveny z olejových extraktů, alkoholových extraktů, vodný extraktů o koncentraci 0,01 g/ml a vodný extraktů o koncentraci 0,1 g/ml. Bylo tedy připraveno celkem 48 různých liposomů. Připravené částice byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu. Na následujících obrázcích (obrázek 10 a 11) jsou ukázány připravené liposomy zachycené pomocí světelného mikroskopu.

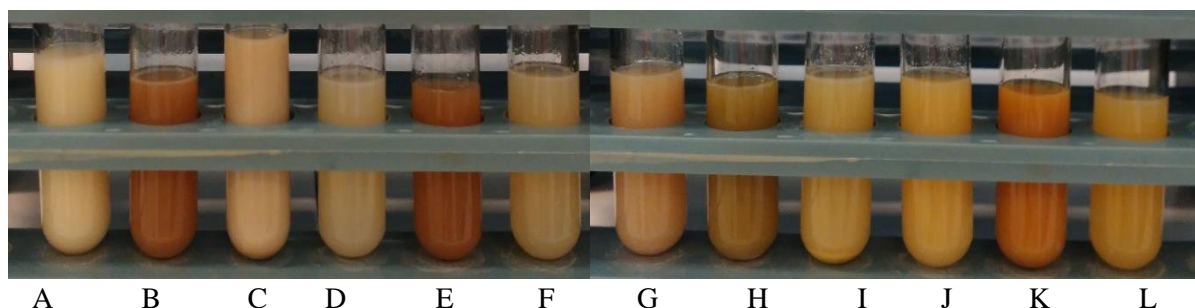


Obrázek 10: Liposomy (zvětění 640x)



Obrázek 11: Detail liposomů (zvětění 1600x)

Připravené roztoky liposomů měly velkou škálu různých barev, pro ilustraci je možné na obrázku 12 vidět všech 12 roztoků alkoholových liposomů. Roztoky se mezi sebou lišily i v rámci jedné rostliny. Rozdíl v barevnosti olejových, alkoholových a vodný liposomů (v tomto pořadí) jsou k vidění na obrázcích 13, 14 a 15.

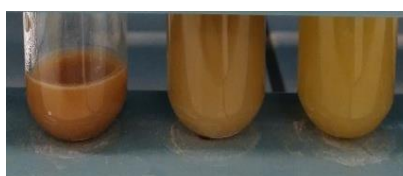


Obrázek 12: Alkoholové liposomy

A-badyán; B-dubová kůra; C-hřebíček; D-kozinec; E-lapacho; F-lichorejšnice; G-muškatový oříšek; H-oregano; I-pepř, J-pomerančová kůra; K-skořice; L-zázvor



Obrázek 13: Hřebíček



Obrázek 14: Oregano



Obrázek 15: Skořice

5.5 Stanovení velikosti připravených částic

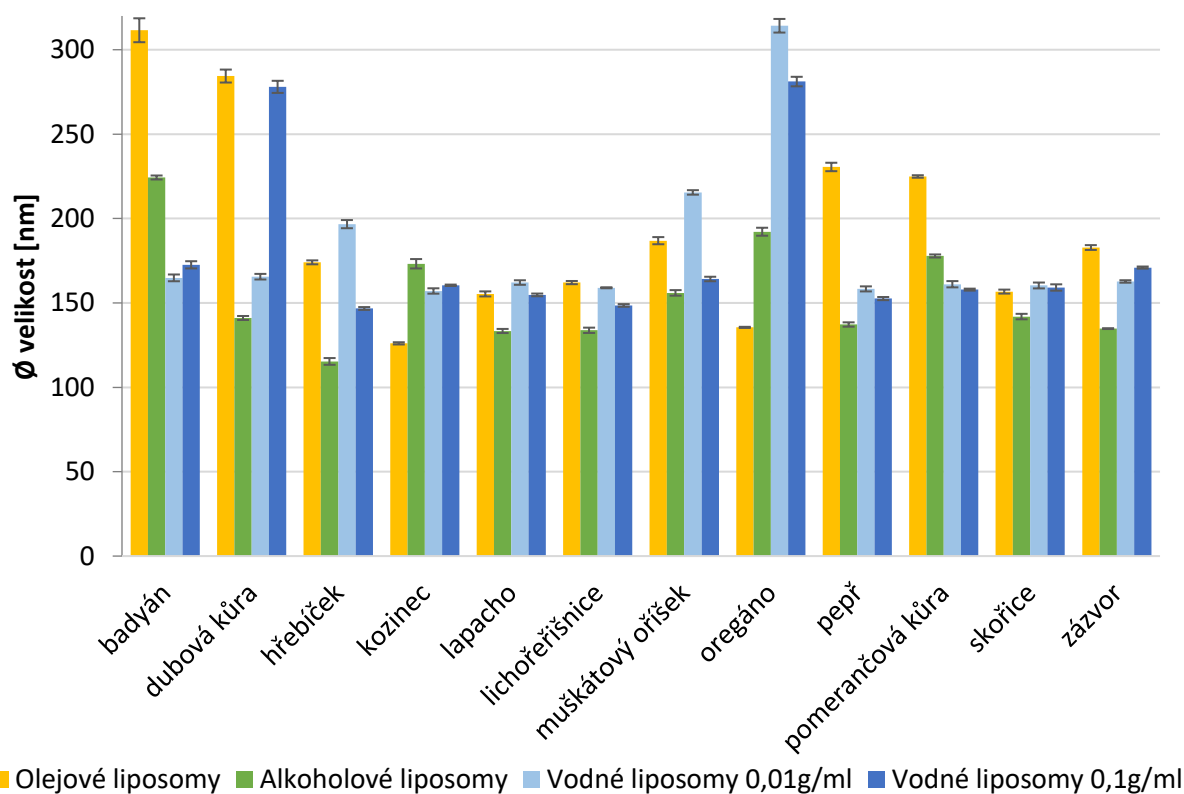
Velikost a distribuce velikosti byla určena podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.3. U všech částic bylo měření provedeno třikrát a získané hodnoty byly zprůměrovány. V tabulce 6 a 7 jsou uvedeny hodnoty polydisperzity a průměrná velikost částic. Pro přehledné zobrazení byl z průměrných velikostí sestaven také graf (obrázek 17).

Tabulka 6: Průměrná velikost a intenzita distribuce velikosti olejových a alkoholových liposomů

	olejové liposomy		alkoholové liposomy	
	PdI	Ø velikost [nm]	PdI	Ø velikost [nm]
badyán	$0,476 \pm 0,024$	$311,5 \pm 7,1$	$0,364 \pm 0,012$	$224,3 \pm 1,2$
dubová kůra	$0,433 \pm 0,006$	$284,4 \pm 3,8$	$0,152 \pm 0,005$	$141,1 \pm 1,2$
hřebíček	$0,206 \pm 0,017$	$174,0 \pm 1,2$	$0,066 \pm 0,004$	$115,3 \pm 2,0$
kozinec	$0,173 \pm 0,013$	$126,0 \pm 0,7$	$0,280 \pm 0,012$	$173,2 \pm 2,8$
lapacho	$0,175 \pm 0,012$	$155,3 \pm 1,5$	$0,148 \pm 0,007$	$133,4 \pm 1,2$
lichorejšnice	$0,234 \pm 0,008$	$162,0 \pm 0,9$	$0,170 \pm 0,007$	$133,8 \pm 1,6$
muškátový oříšek	$0,243 \pm 0,004$	$186,9 \pm 2,1$	$0,201 \pm 0,007$	$155,9 \pm 1,6$
oregano	$0,191 \pm 0,005$	$135,5 \pm 0,3$	$0,367 \pm 0,006$	$192,2 \pm 2,4$
pepř	$0,349 \pm 0,045$	$230,5 \pm 2,5$	$0,172 \pm 0,014$	$137,2 \pm 1,3$
pomerančová kůra	$0,379 \pm 0,007$	$224,9 \pm 0,7$	$0,303 \pm 0,019$	$177,8 \pm 0,9$
skořice	$0,192 \pm 0,004$	$156,7 \pm 1,2$	$0,168 \pm 0,008$	$141,9 \pm 1,6$
zázvor	$0,242 \pm 0,004$	$182,8 \pm 1,4$	$0,178 \pm 0,010$	$134,8 \pm 0,2$

Tabulka 7: Průměrná velikost a intenzita distribuce velikosti vodný liposomů

	vodné liposomy 0,01 g/ml		vodné liposomy 0,1 g/ml	
	PdI	Ø velikost [nm]	PdI	Ø velikost [nm]
badyán	0,189 ± 0,011	164,8 ± 2,0	0,237 ± 0,006	172,6 ± 2,1
dubová kůra	0,156 ± 0,011	165,5 ± 1,7	0,446 ± 0,023	278,0 ± 3,6
hřebíček	0,305 ± 0,014	196,7 ± 2,4	0,197 ± 0,012	146,7 ± 0,8
kozinec	0,182 ± 0,004	157,1 ± 1,6	0,175 ± 0,018	160,4 ± 0,4
lapacho	0,213 ± 0,010	162,1 ± 1,3	0,189 ± 0,007	154,7 ± 0,8
ličořeřišnice	0,197 ± 0,001	159,0 ± 0,3	0,168 ± 0,017	148,5 ± 0,8
muškátový oříšek	0,344 ± 0,036	215,5 ± 1,3	0,195 ± 0,013	164,2 ± 1,3
oregáno	0,406 ± 0,005	314,2 ± 4,0	0,416 ± 0,022	281,1 ± 2,8
pepř	0,178 ± 0,013	158,3 ± 1,5	0,181 ± 0,007	152,6 ± 0,9
pomerančová kůra	0,200 ± 0,022	161,1 ± 1,9	0,182 ± 0,014	157,9 ± 0,6
skořice	0,217 ± 0,018	160,3 ± 1,7	0,210 ± 0,006	159,1 ± 1,9
zázvor	0,208 ± 0,003	162,7 ± 0,7	0,221 ± 0,014	170,9 ± 0,6



Obrázek 17: Průměrná velikost připravených liposomů

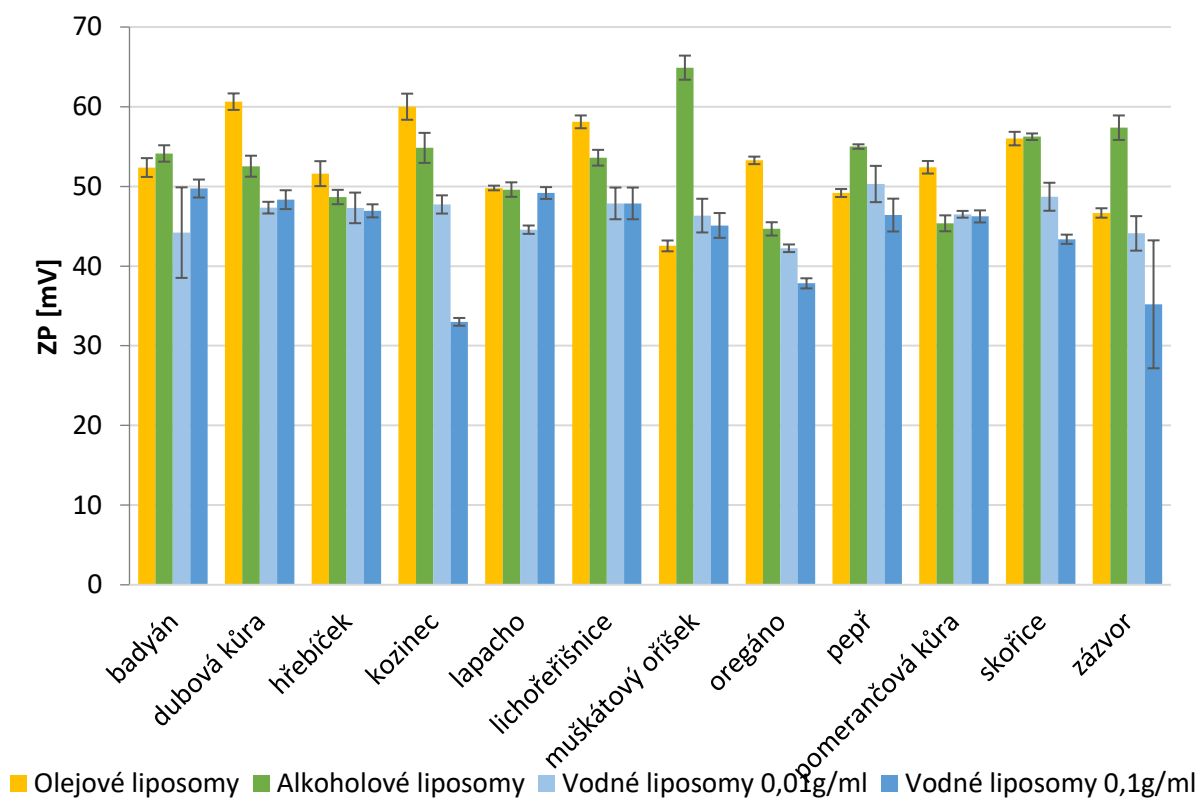
Z dosažených výsledků je zřejmé, že většina částic měla přibližně stejnou průměrnou velikost a to v intervalu od 100 do 200 nm. Největší průměrnou velikost částic $314,5 \pm 4,0$ nm měly liposomy z vodného extraktu oregána o koncentraci 0,01 g/ml. Skoro stejnou průměrnou velikost měly i liposomy připravené z olejového extraktu badyánu $311,5 \pm 7,1$ nm. Nejmenší částice byly naopak liposomy připravené z alkoholového extraktu hřebíčku $115,3 \pm 2,0$ nm.

5.6 Stanovení stability připravených částic

Stabilita liposomů byla stanovena podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.3. U všech liposomů bylo měření provedeno třikrát a získané hodnoty byly poté zprůměrovány. V tabulce 5 jsou uvedené průměrné hodnoty zeta potenciálů měřených částic.

Tabulka 5: Stabilita připravených částic

	olejové liposomy	alkoholové liposomy	vodné liposomy 0,01g/ml	vodné liposomy 0,1g/ml
	ZP [mV]	ZP [mV]	ZP [mV]	ZP [mV]
badyán	-52,4 ± 1,2	-54,1 ± 1,0	-44,2 ± 5,7	-49,7 ± 1,1
dubová kůra	-60,6 ± 1,0	-52,5 ± 1,3	-47,3 ± 0,7	-48,3 ± 1,2
hřebíček	-51,6 ± 1,6	-48,7 ± 0,9	-47,3 ± 1,9	-46,9 ± 0,8
kozinec	-60,0 ± 1,6	-54,8 ± 1,9	-47,7 ± 1,1	-33,0 ± 0,5
lapacho	-49,8 ± 0,3	-49,6 ± 0,9	-44,6 ± 0,5	-49,2 ± 0,7
ličořeřišnice	-58,1 ± 0,8	-53,6 ± 1,0	-47,9 ± 2,0	-47,9 ± 2,0
muškátový oříšek	-42,5 ± 0,7	-64,9 ± 1,5	-46,3 ± 2,1	-45,1 ± 1,6
oregáno	-53,3 ± 0,5	-44,7 ± 0,8	-42,2 ± 0,5	-37,8 ± 0,6
pepř	-49,2 ± 0,5	-55,0 ± 0,3	-50,3 ± 2,3	-46,4 ± 2,1
pomerančová kůra	-52,4 ± 0,8	-45,4 ± 1,0	-46,5 ± 0,4	-46,2 ± 0,8
skořice	-56,0 ± 0,8	-56,2 ± 0,4	-48,7 ± 1,8	-43,4 ± 0,6
zázvor	-46,7 ± 0,6	-57,4 ± 1,5	-44,1 ± 2,2	-35,2 ± 8,0

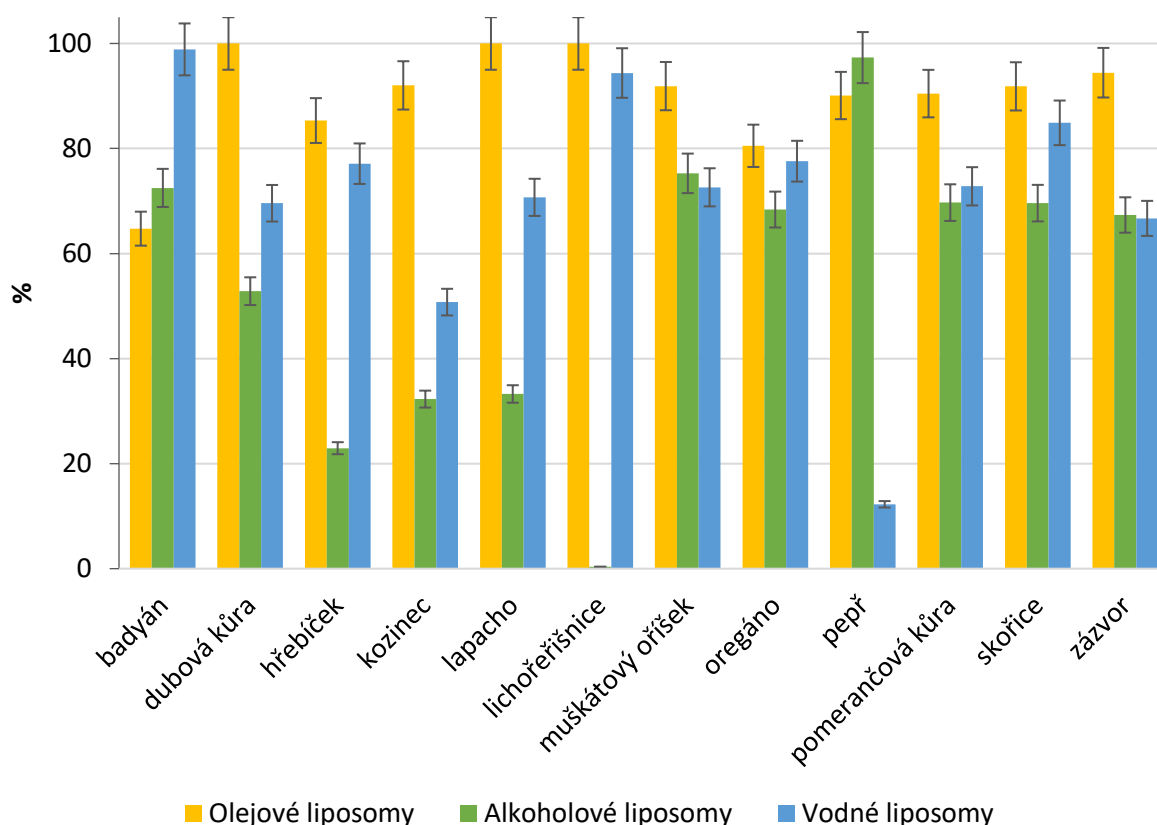


Obrázek 16: Stabilita připravených částic - absolutní hodnota zeta potenciálu

Absolutní hodnota zeta potenciálu 30 mV je považována za hranici stability, z grafu (obrázek 16) je zřetelně vidět, že všechny připravené liposomy tuto hranici překonaly a tedy mohou být považovány za stabilní. Z hlediska různých typů extraktů měly liposomy s obsahem olejových a alkoholových extraktů mnohem vyšší stabilitu než liposomy z extraktů vodných. Většina z olejových a alkoholových liposomů vykazovala stabilitu vyšší než 50 mV. Nejvyšší stabilita pak byla zjištěna u liposomů s alkoholovým extraktem z muškátového oříšku (64,9 mV). Naopak nejnižší stabilitu vykazovaly liposomy s vodným extraktem o koncentraci 0,1 g/ml z kozince (33,0 mV).

5.7 Stanovení enkapsulační účinnosti liposomů

Enkapsulační účinnost byla stanovena u liposomů z olejových, alkoholových a vodných extraktů. Všechny vzorky liposomů byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.6. Při stanovení enkapsulační účinnosti bylo postupováno podle postupu z kapitoly 4.7.1. Liposomy tak byly centrifugovány při 11 000 ot/min po dobu 1 hodiny. Supernatant byl slit a bylo v něm stanoveno množství celkových polyfenolů, stejně jako v roztoku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody a vyjádřena v procentech. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr, získané výsledky jsou zaznamenány v tabulce 8 a v následujícím grafu (obrázek 18).



Obrázek 18: Enkapsulační účinnosti připravených liposomů

Z výsledků je jasné patrné, že nejvyšší enkapsulační účinnost všeobecně vykazovaly liposomy z olejových extraktů. U některých z těchto liposomů byla dokonce stanovena enkapsulační účinnost 100 % a to konkrétně u liposomů z dubové kůry, lapacha a lichořeřišnice.

U liposomů z vodných extraktů vykazoval nejvyšší enkapsulační účinnost extrakt z badyánu (99 %), naopak nejnižší enkapsulační účinnost byla zjištěna u extraktu z pepře (12 %). Nejvyšší enkapsulační účinnost z alkoholových extraktů byla stanovena u extraktu z pepře (97 %) a nejnižší byla zjištěna u extraktu z lichořeřišnice (0,4 %).

Tabulka 8: Enkapsulační účinnost liposomů

	olejové liposomy		alkoholové liposomy		vodné liposomy	
	Cenk [mg/ml]	EU [%]	Cenk [mg/ml]	EU [%]	Cenk [mg/ml]	EU [%]
badyán	0,03	64,7	0,28	72,5	0,49	98,9
dubová kůra	0,34	100,0	0,82	52,8	2,31	69,6
hřebíček	2,15	85,3	0,46	22,9	0,78	77,1
kozinec	0,10	92,0	0,04	32,3	0,06	50,8
lapacho	0,32	100,0	0,11	33,3	0,20	70,7
lichořeřišnice	0,03	100,0	0,00	0,4	0,14	94,4
muškátový oříšek	0,60	91,9	0,82	75,3	0,15	72,6
oregáno	0,48	80,5	1,05	68,4	2,83	77,6
pepř	0,32	90,1	3,91	97,3	0,02	12,3
pomerančová kůra	0,04	90,5	0,47	69,7	0,55	72,8
skořice	0,95	91,8	1,14	69,6	0,60	84,9
zázvor	2,22	94,4	0,46	67,3	0,50	66,7

Z hlediska enkapsulované množství polyfenolů bylo naměřeno nejvíce těchto aktivních látek v liposomech z olejových extraktů zázvoru (2,22 mg/ml) a hřebíčku (2,16 mg/ml), dále pak z vodných extraktů z dubové kůry (2,31 mg/ml) a oregána (2,83 mg/ml) a u alkoholového extraktu z pepře (3,91 mg/ml), skořice (1,14 mg/ml) a oregána (1,05 mg/ml).

5.8 Stanovení dlouhodobé stability liposomů

Pro stanovení dlouhodobé stability připravených liposomů bylo postupováno dle postupu z kapitoly 4.7.2. Stabilita byla zkoumána po měsíci od přípravy liposomů a byla stanovována u liposomů z olejových, alkoholových i vodných extraktů uchovávaných ve vodném prostředí při teplotě 5 °C. Stabilita byla analyzována z hlediska obsahu polyfenolů, které zůstaly enkapsulované v liposomech. Výsledné množství bylo vztaženo na enkapsulované množství a vyjádřeno v procentech. Výsledky byly zpracovány do tabulek 9, 10 a 11, kde jsou uvedeny i koncentrace polyfenolů v liposomech na počátku a po měsíci skladování.

Z tabulky 9 je patrné, že dlouhodobá stabilita olejových liposomů není příliš vysoká. Pouze liposomy z pomerančové kůry vykazovaly 100% stabilitu. U liposomů z lichořeřišnice a hřebíčku byla zjištěna dlouhodobá stabilita nad 30 %. Nejnižší stabilita byla zjištěna u kozince, u kterého v liposomech po měsíci nezbylo žádné množství polyfenolů.

Tabulka 9: Dlouhodobá stabilita olejový liposomů

	Olejové liposomy		
	původní c _{enk} [mg/ml]	zůstatek c _{enk} [mg/ml]	zůstatek [%]
badyán	0,03	0,00	1,8
dubová kůra	0,34	0,01	2,8
hřebíček	2,15	0,74	34,5
kozinec	0,10	0,00	0,0
lapacho	0,32	0,02	7,0
lichorejšnice	0,03	0,01	33,8
muškátový oříšek	0,60	0,10	16,2
oregáno	0,48	0,07	14,1
pepř	0,32	0,04	11,1
pomerančová kůra	0,04	0,04	100,0
skořice	0,95	0,10	10,3
závor	2,22	0,12	5,5

Tabulka 10: Dlouhodobá stabilita alkoholových liposomů

	Alkoholové liposomy		
	původní c _{enk} [mg/ml]	zůstatek c _{enk} [mg/ml]	zůstatek [%]
badyán	0,28	0,01	4,3
dubová kůra	0,82	0,02	2,3
hřebíček	0,46	0,46	100,0
kozinec	0,04	0,01	24,2
lapacho	0,11	0,00	0,0
lichorejšnice	0,00	0,00	0,0
muškátový oříšek	0,82	0,05	5,9
oregáno	1,05	0,03	3,0
pepř	3,91	0,04	1,0
pomerančová kůra	0,47	0,00	0,0
skořice	1,14	0,02	2,0
závor	0,46	0,00	0,1

Z tabulky 10 je vidět, že ani dlouhodobá stabilita alkoholových liposomů nebyla vysoká. Liposomy z hřebíčku sice vykazovaly 100% zůstatek polyfenolů v liposomech, avšak ostatní roztoky liposomů nebyly stabilní. Pouze liposomy z kozince obsahovaly 24,24 % polyfenolů. Dokonce až tři druhy liposomů (z lapacha, lichorejšnice a pomerančové kůry) po měsíci neobsahovaly žádné polyfenolů.

V tabulce 11 je zřetelně k vidění, že vodné liposomy rovněž není možné považovat za dlouhodobě stabilní. Výjimkou byly liposomy z oregána, které po měsíci stále obsahovaly 100 % enkapsulovaných polyfenolů. Dobrou zprávou je, že ve všech vodných liposomech po měsíci bylo stanovena aspoň nízké procento z původních enkapsulovaných polyfenolů.

Proto lze považovat liposomy z vodných extraktů za dlouhodobě stabilnější než liposomy připravené z olejových a alkoholových extraktů. Nicméně je důležité zmínit, že nízké

množství naměřených polyfenolů v liposomech po měsíci skladování mohlo být způsobeno chybou při izolaci polyfenolů z liposomů. Při procesu rozpouštění liposomů, tak mohlo dojít k částečné degradaci enkapsulovaných složek, případně nemuselo dojít k dokonalému uvolnění všech enkapsulovaných polyfenolů.

Tabulka 11: Dlouhodobá stabilita vodných liposomů

	Vodné liposomy 0,1g/10ml		
	původní c _{enk} [mg/ml]	zůstatek c _{enk} [mg/ml]	zůstatek [%]
badyán	0,49	0,01	1,7
dubová kůra	2,31	0,05	2,2
hřebíček	0,78	0,03	3,3
kozinec	0,06	0,02	34,2
lapacho	0,20	0,03	13,3
ličořeřišnice	0,14	0,01	6,6
muškátový oříšek	0,15	0,00	2,1
oregáno	2,83	0,03	1,1
pepř	0,02	0,02	100,0
pomerančová kůra	0,55	0,02	4,4
skořice	0,60	0,01	1,7
zázvor	0,50	0,03	5,9

5.9 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita rostlinných extraktů a liposomů z nich připravených byla testována na dvou kmenech bakterií - *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Byly prováděny dva druhy antimikrobiálních testů – diluční metoda dle postupu v kapitole 4.9.1 a difúzní metoda dle postupu v kapitole 4.9.2. Zpracování získaných dat bylo z důvodu přehlednosti rozděleno na dvě části. Jako první byly analyzovány účinky rostlin na grampozitivní kmen *Micrococcus luteus*, poté byly vyhodnoceny účinky na gramnegativní kmen *Serratia marcescens*.

5.9.1 Kmen *Micrococcus luteus*

Bakteriální kmen *Micrococcus luteus* byl podroben testování, při kterých byla zkoumána antibakteriální aktivita olejových a vodných extraktů a liposomů připravených z olejových, alkoholových i vodných extraktů.

5.9.1.1 Olejové extrakty a liposomy

Z důvodů konzistence olejových extraktů byla k testování jejich účinků použita difúzní metoda. U vytvořených inhibičních zón byla změřena jejich velikost a údaje byly zpracovány do tabulky 12. Na obrázcích 19 a 20 jsou k vidění příklady vytvořených inhibičních zón.



Obrázek 19: Oregáno



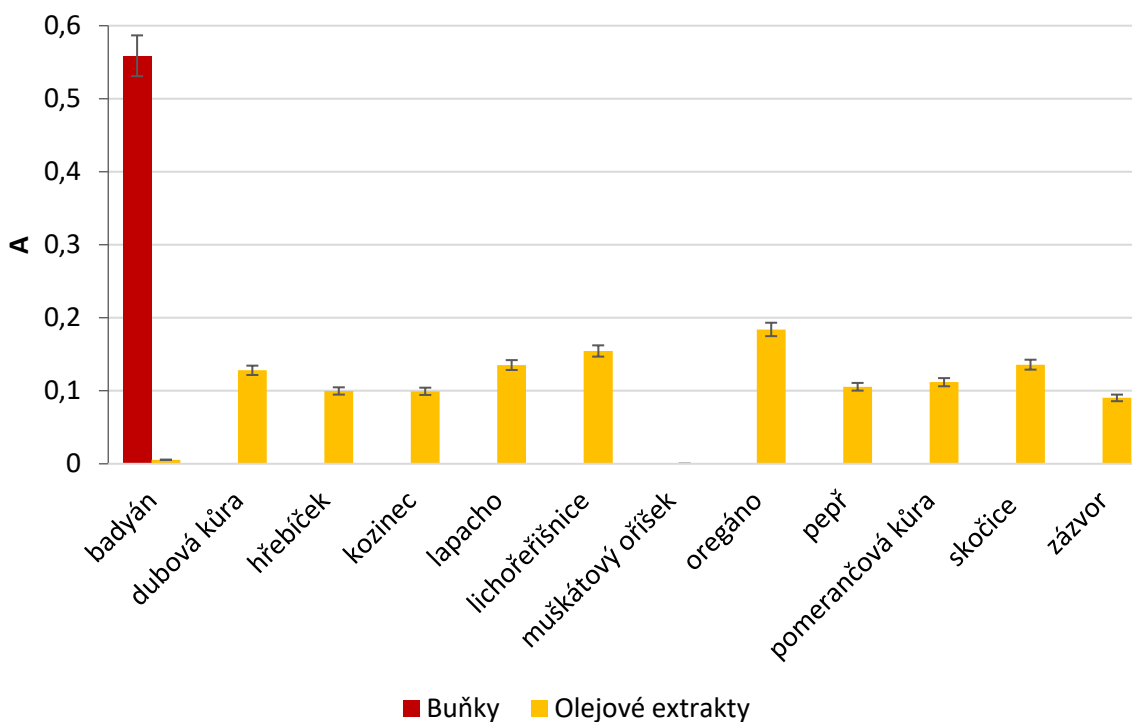
Obrázek 20: Pepř

Tabulka 12: Inhibiční zóny olejových extraktů – *Micrococcus luteus*

extrakt	velikost zóny [mm]	extrakt	velikost zóny [mm]
badyán	0	muškátový oříšek	0,5
dubová kůra	3	oregáno	5
hřebíček	0	pepř	1,5
kozinec	1	pomerančová kůra	1
lapacho	0	skořice	0
ličořeřišnice	0	zázvor	0,5

Ze získaných výsledků (tabulce 12) je patrné, že největší inhibiční zóna se vytvořila kolem extraktů z oregána. K nevytvoření zón došlo u extraktů ze hřebíčku, lichořeřišnice a skořice, lapacha a badyánu. Testované vzorky však byly velmi tuhé a jejich neúčinnost tak byla nejspíše způsobena limitací difúze.

Antimikrobiální účinnost olejových liposomů byla analyzována diluční metodou pomocí měření zákalu při 630 nm. Výsledky jsou zpracovány v následujícím grafu (obrázek 21).

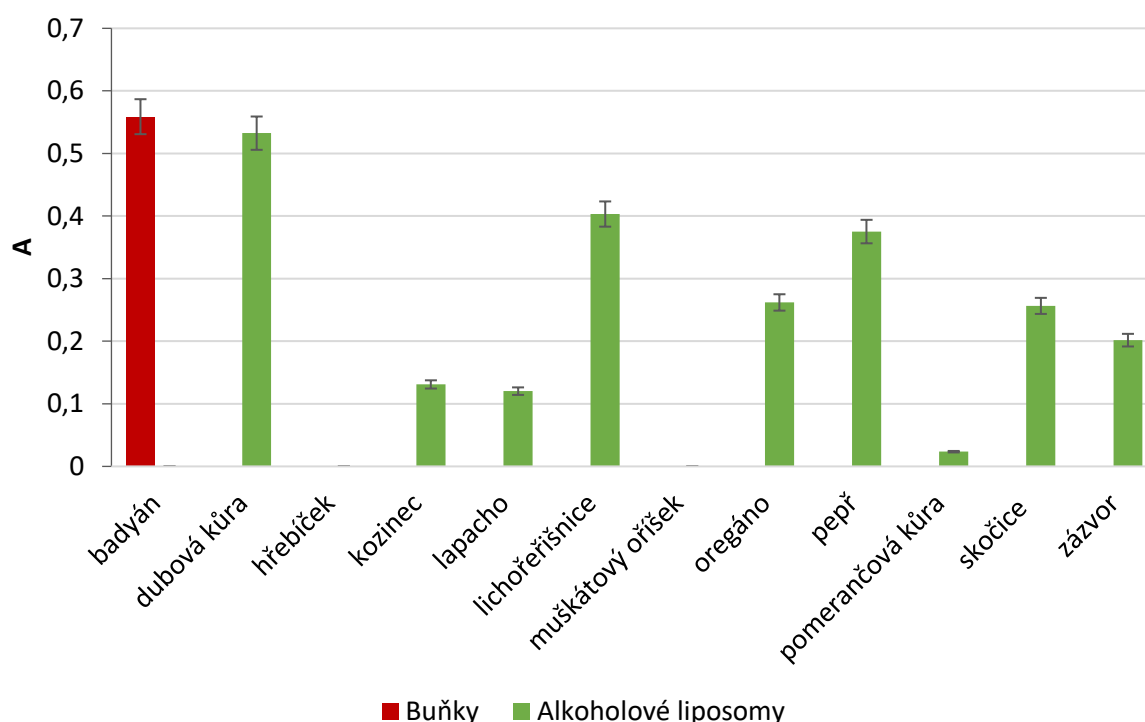


Obrázek 21: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – olejové liposomy

Z grafu (obrázek 21) je zřejmé, že všechny liposomy z olejových extraktů vykazovaly vysokou antimikrobiální účinnost. Jako nejvíce antibakteriální byly určeny liposomy z badyánu a muškátového oříšku. Aktivita u liposomů z muškátového oříšku byla navíc stanovena jako 100%. Nejmenší účinek byl zjištěn u liposomů z oregána.

5.9.1.2 Alkoholové liposomy

Jelikož obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita alkoholových extraktů nebyla vyšší než obsah a aktivita stanovovaných látek ve vodných a olejových extraktech, nebyla zkoumána antimikrobiální aktivita samostatných alkoholových extraktů. Avšak u alkoholových liposomů byl proveden antimikrobiální test diluční metodou. Výsledky byly zpracovány do grafu (obrázek 22).



Obrázek 22: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – alkoholové liposomy

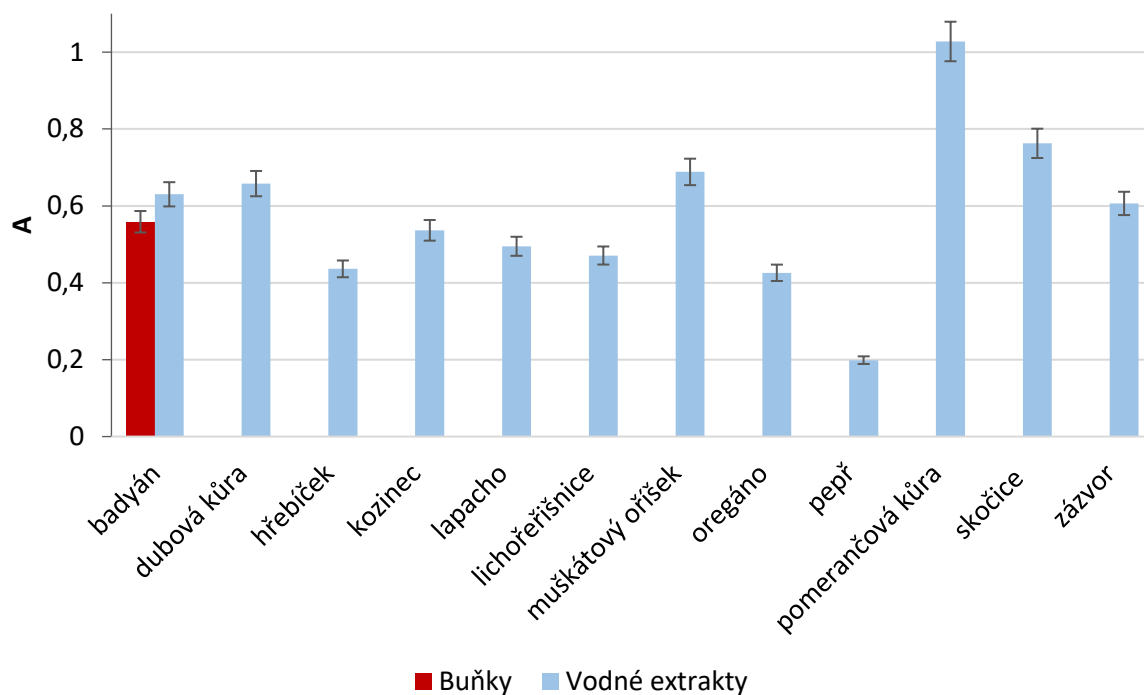
V grafu (obrázek 22) jsou vidět výsledky antimikrobiálního testu, který prokázal, že všechny alkoholové liposomy vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Nejslabší, až téměř nulovou aktivitu prokázaly liposomy z dubové kůry. Nejvyšší aktivita byla naopak zjištěna u liposomů z pomerančové kůry, badyánu, hřebíčku a muškátového oříšku. V případě liposomů z badyánu, hřebíčku a muškátového oříšku byla dokonce zjištěn 100% antimikrobiální účinnost.

5.9.1.3 Vodné extrakty a liposomy

Při zkoumání antimikrobiální aktivity vodných extraktů a liposomů s jejich obsahem byla použita diluční metoda. Z důvodů lepších výsledků byly k antimikrobiálním testům použity silnější vodné extrakty o koncentraci 0,1 g/ml. Jako první byla analyzována účinnost vodných extraktů, naměřená data byla zpracována do grafu (obrázek 23).

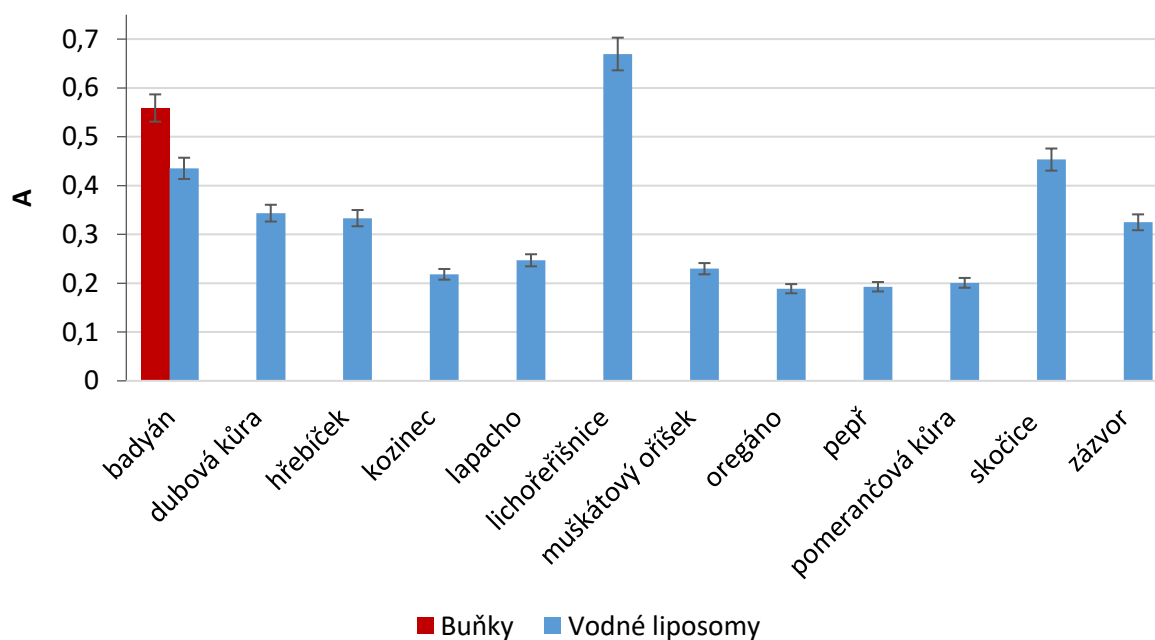
Z dosažených výsledků je patrné, že polovina z testovaných extraktů nevykazovala žádné antibakteriální účinky, nejhorší výsledky vykazoval extrakt pomerančové kůry, který naopak podporoval růst mikroorganismů. U extraktů z hřebíčku, kozince, lapacha, lichořeřišnice,

oregána a pepře byla prokázána inhibice růstu grampozitivních bakterií. Přičemž nejlepší antimikrobiální účinky byly zjištěny u extraktu z pepře.



Obrázek 23: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – vodné extrakty

Dále byla zkoumána antimikrobiální aktivita liposomů z vodných extraktů. Získaná data byla přehledně zpracována do grafu (obrázek 24). Na první pohled je z výsledků jasné patrné, že vodné liposomy měli obecně vyšší účinnost než samotné vodné extrakty. Až na liposomy z lichořeřišnice, byla u všech liposomů zjištěna antimikrobiální aktivita. Mezi nejúčinnější patřily liposomy z oregána, pepře a pomerančové kůry.



Obrázek 24: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – vodné liposomy

5.9.2 Kmen *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je bakteriální kmen řazený do skupiny gramnegativních bakterií. V této práci byl podroben testům, při kterých byla zkoumána antibakteriální aktivita olejových a vodných extraktů a liposomů s obsahem olejových, alkoholových a vodných extraktů.

5.9.2.1 Olejové extrakty a liposomy

Jelikož byly olejové extrakty tuhé nebo olejové konzistence byla při testování jejich účinků použita difúzní metoda, při které se pozorovaly vzniklé inhibiční zón. Zóny byly poté nafoceny (příklady - obrázky 25 a 26) a velikosti zón byly změřeny. Výsledky jsou k vidění v tabulce 14.



Obrázek 25: Skořice



Obrázek 26: Hřebíček

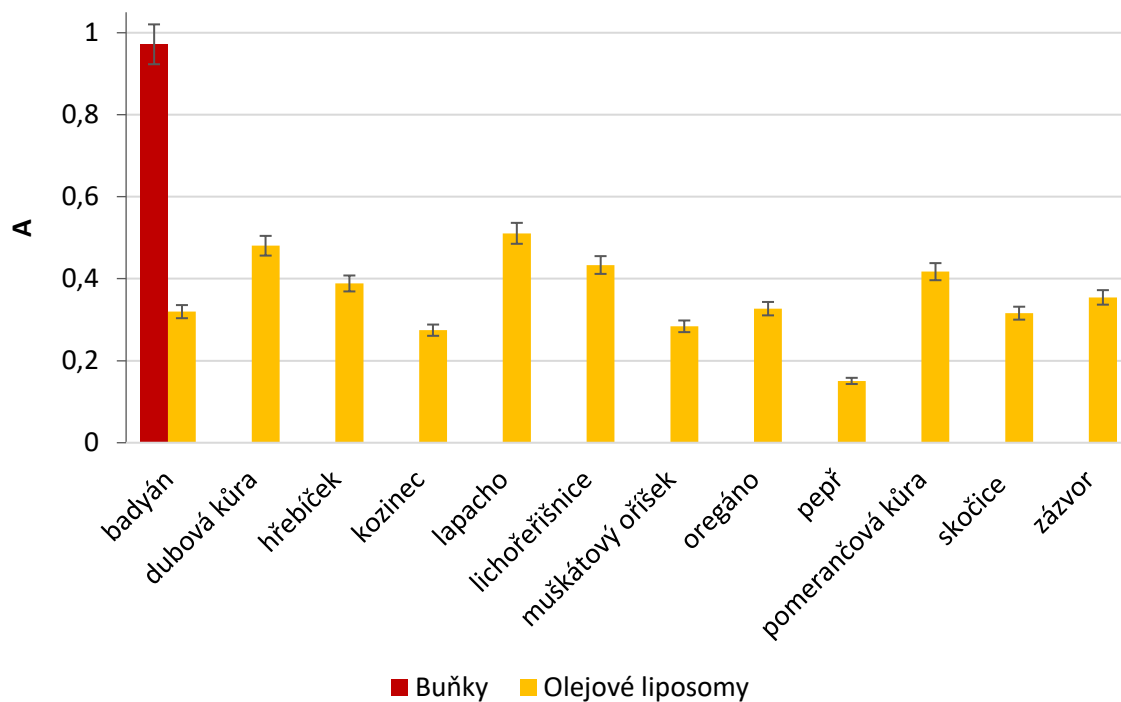
Tabulka 14: Inhibiční zóny olejových extraktů – *Serratia marcescens*

extrakt	velikost zóny [mm]	extrakt	velikost zóny [mm]
badyán	0	muškátový oříšek	0
dubová kůra	0	oregáno	0,5
hřebíček	2	pepř	2,5
kozínek	0	pomerančová kůra	0
lapacho	0	skořice	3
ličořeřišnice	0	zázvor	0

Z tabulky 14 je patrné, že největší inhibiční zóna vznikla kolem extraktů ze skořice a pepře. Bohužel u většiny extraktů nedošlo k vytvoření žádné zóny. Při srovnání s výsledky testování na *Micrococcus luteus* je zřejmé, že extrakty měly všeobecně vyšší účinky proti grampozitivnímu kmeni *Micrococcus luteus*, než proti gramnegativnímu kmeni *Serratia marcescens*.

Olejové liposomy byly testovány diluční metodou. Výsledky byly zpracovány do následujícího grafu (obrázek 27).

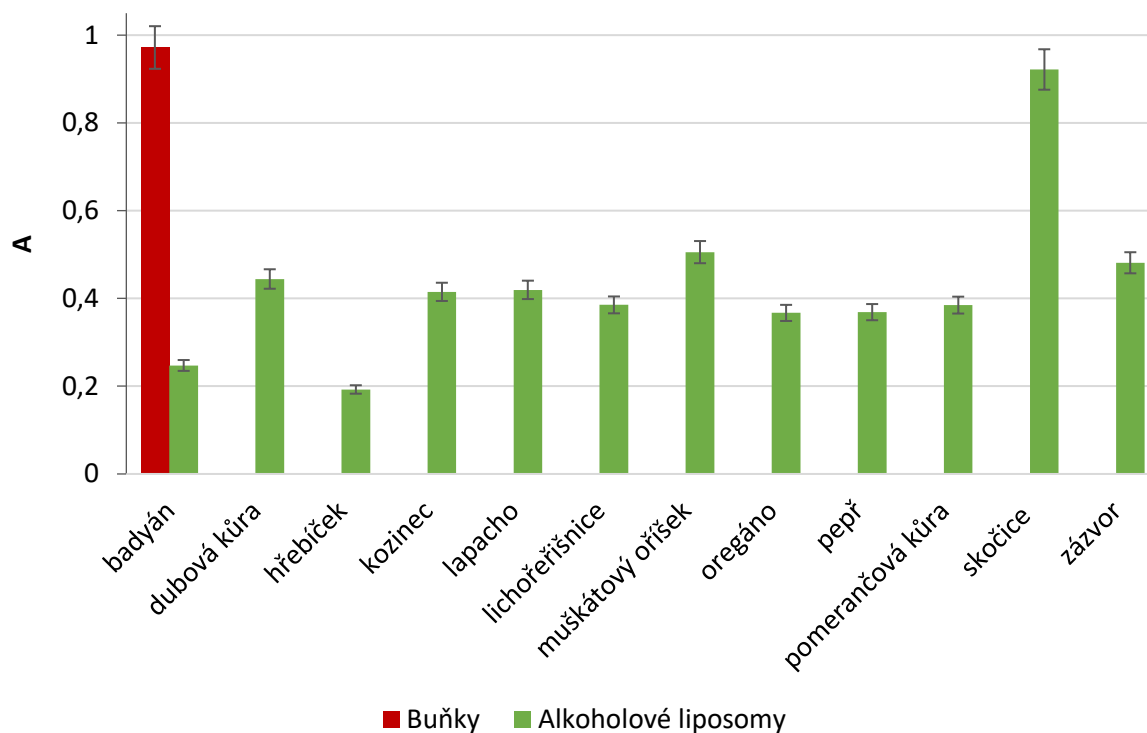
Ze získaných výsledků byly analyzovány antimikrobiální aktivity olejových liposomů. Je zřejmé, že všechny liposomy vykazovaly dobrou účinnost proti testovanému kmeni. Nejmenší účinky prokázaly liposomy z lapacha a liposomy z extraktů z dubové a pomerančové kůry. Naopak nejvyšší aktivita byla zjištěna u liposomů s obsahem extraktů z pepře.



Obrázek 27: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – olejové liposomy

5.9.2.2 Alkoholové liposomy

Stejně jako u testů proti kmeni *Micrococcus luteus*, byla i u kmene *Serratia marcescens* zkoumána antimikrobiální aktivita pouze u alkoholových liposomů. Získaná data byla zpracována do grafu (obrázek 28).

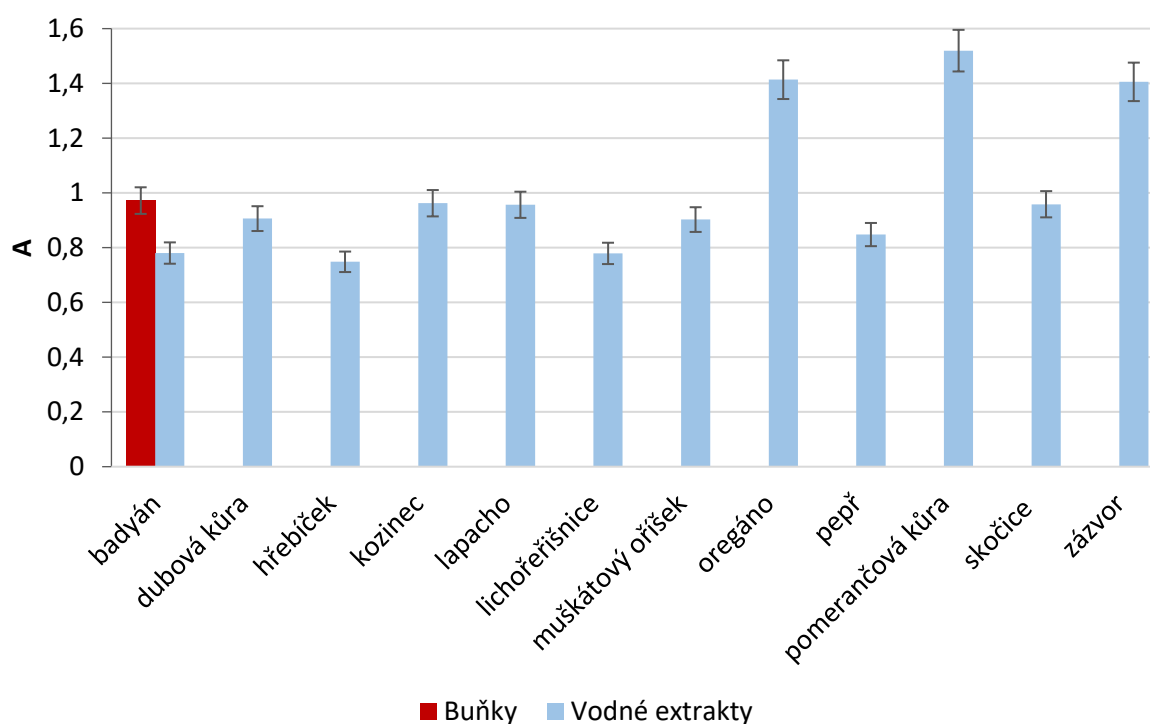


Obrázek 28: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – alkoholové liposomy

Z dosažených výsledků je zřejmé, že stejně jako olejové liposomy, všechny alkoholové liposomy vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Účinnost byla v rámci liposomů celkem vyrovnaná, pod 50 %. Nejvyšší inhibiční účinky byly zjištěny u liposomů z hřebíčku a badyánu. Nejmenší inhibiční účinky naopak prokázaly liposomy ze skořice, kde byla účinnost téměř nulová.

5.9.2.3 Vodné extrakty a liposomy

Pomocí diluční metody byly analyzované antimikrobiální vlastnosti vodných extraktů a liposomů s jejich obsahem. Aktivita vodných extraktů o koncentraci 0,1 g/ml byla zpracována do následujícího grafu.

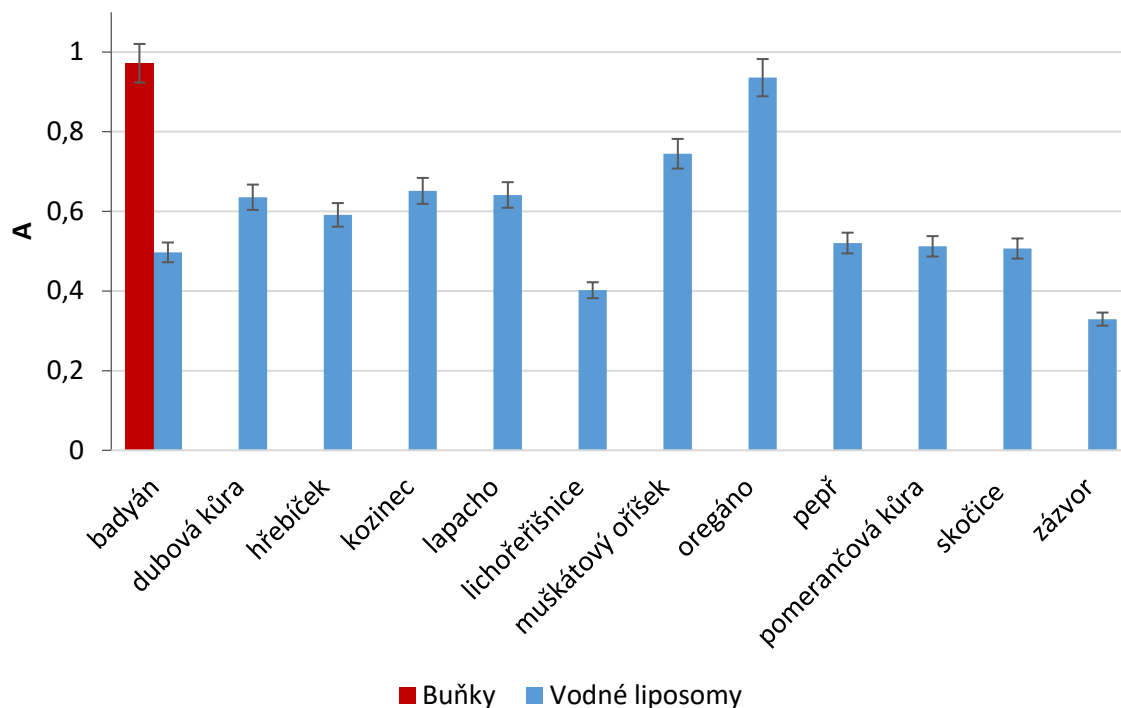


Obrázek 29: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – vodné extrakty

Antimikrobiální aktivita vodných extraktů nebyla příliš vysoká, což je viditelné i v grafu (obrázek 29). Extrakty z oregána, pomerančové kůry a zázvoru neprokázaly žádnou aktivitu, naopak růst podpořily. Extrakty z kozince, lapacha a skořice prokázaly prakticky nulovou aktivitu. Nejvyšší účinnost pak byla zjištěna u extraktu z hřebíčku.

Stejným způsobem jako byly testovány účinky vodných extraktů, byly testovány i účinky liposomů s obsahem stejných vodných extraktů. Získané výsledky jsou zaznamenány v grafu (obrázek 30).

Ze získaných výsledků je vidět, že všechny vodné liposomy vykazovaly antimikrobiální účinnost proti testovanému kmeni. Nejnižší aktivita byla zjištěna u liposomů z oregána. Naopak nejvyšší účinnost byla stanovena u liposomů ze zázvoru.



Obrázek 30: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – vodné liposomy

5.9.3 Srovnání antimikrobiální účinnosti liposomů

Pomocí diluční metody byly získány informace o antimikrobiální účinnosti připravených extraktů a liposomů proti testovaným kmenům *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Obecně lze říci, že enkapsulace všech testovaných extraktů do liposomových částic velmi výrazně navýšila jejich antimikrobiální účinek.

Pro přehledné srovnání antimikrobiální aktivity byla vytvořena tabulka 15, která shrnuje účinky všech testovaných liposomů.

Tabulka 15: Srovnání antimikrobiální účinnosti liposomů

	<i>Micrococcus luteus</i>			<i>Serratia marcescens</i>		
	Olejové	Alkoholové	Vodné	Olejové	Alkoholové	Vodné
badyán	+++	+++	+	++	+++	+
dubová kůra	+++	+	+	++	++	+
hřebíček	+++	+++	+	++	+++	+
kozinec	+++	+++	++	+++	++	+
lapacho	+++	+++	++	+	++	+
ličořeřišnice	+++	+	-	++	++	++
muškátový oříšek	+++	+++	++	+++	+	+
oregáno	++	++	++	++	++	+
pepř	+++	+	++	+++	++	+
pomerančová kůra	+++	+++	++	++	++	+
skořice	+++	++	+	++	+	+
zázvor	+++	++	+	++	++	++

+++ – účinnost nad 70 %; ++ – účinnost nad 50 %; + – účinnost pod 50 %; - – neúčinné

Obecně nejvyšší účinnosti proti kmeni *Micrococcus luteus* měly dle výsledků olejové liposomy, až na liposomy z oregána, měly všechny liposomy účinnost nad 70 %. Polovina liposomů z alkoholových extraktů (badyán, hřebíček, kozinec, lapacho, muškátový oříšek a pomerančová kůra) vykazovala rovněž vysoký účinek a měly účinnost nad 70 %. Nejslabší účinky proti *Micrococcus luteus* vykazovaly vodné liposomy, liposomy z lichořeřišnice dokonce neměly účinky žádné.

Proti kmeni *Serratia marcescens* měly olejové a alkoholové liposomy srovnatelnou účinnost, avšak účinnost byla velmi různorodá. Nejúčinnější liposomy s olejovým extraktem byly částice z kozince, muškátového oříšku a pepře. U alkoholových extraktů pak vynikaly liposomy z badyánu a hřebíčku. Nejslabší účinky byly opět zjištěny u vodných liposomů, ale všechny liposomy vykazovaly alespoň částečnou účinnost.

Z celkového hlediska při zkoumání účinnosti proti oběma testovaným kmenům, nejlepších výsledků z olejových liposomů dosáhly liposomy z kozince, muškátového oříšku a pepře, které měly proti oběma bakteriálním kmenům účinnost nad 70 %. Z alkoholových liposomů měly nejlepší výsledky liposomy z badyánu a hřebíčku, opět byla stanovena účinnost proti oběma bakteriím nad 70 %.

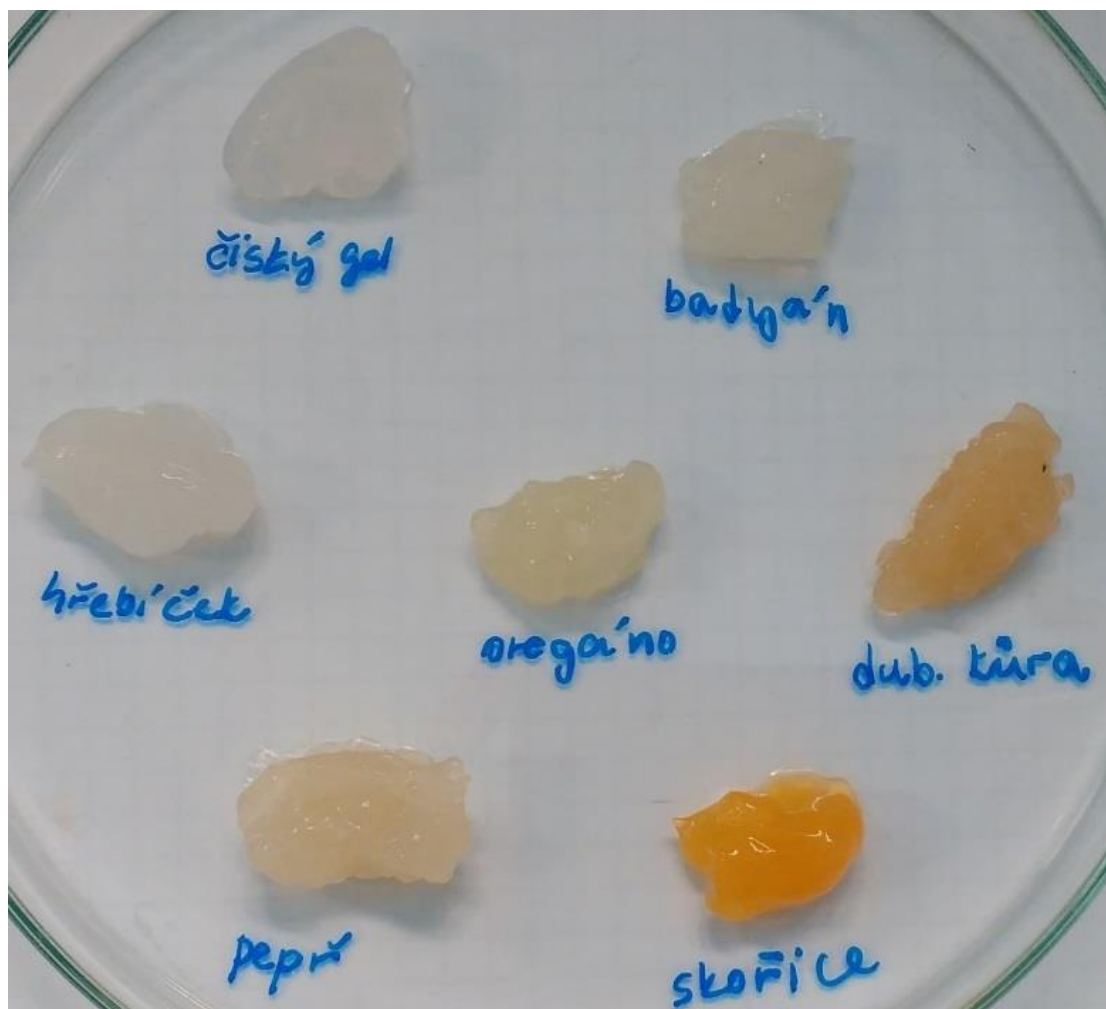
5.10 Příprava gelů

Gely byly připraveny podle postupu uvedeném v kapitole 4.10 z vybravých roztoků liposomů. U připravených gelů byla zkoumána jejich barva a vůně. Tyto vlastnosti by totiž mohly ovlivnit jejich další aplikaci do kosmetických nebo farmaceutických výrobků. Gely byly vytvořeny z olejových liposomů z oregána a hřebíčku, z alkoholových liposomů ze skořice a badyánu, z vodných liposomů z pepře a dubové kůry. Vlastnosti gelů jsou shrnuty v tabulce 16.

Tabulka 16: Vlastnosti gelů

liposomy	barva	vůně
badyán (alkoholové)	nažloutlá mléčná	slabá vůně rostliny
dubová kůra (vodné)	světlé hnědá	neutrální
hřebíček (olejové)	mléčná	středně silná vůně rostliny
oregáno (olejové)	světle zelená	slabá vůně rostliny
pepř (vodné)	světle hnědá	slabá vůně rostliny
skořice (alkoholové)	oranžová	silná vůně

Na následujícím obrázku 31 jsou zobrazeny připravené gely. Gely z badyánu a hřebíčku mají prakticky stejnou barvu jako čistý gel. Gely z ogerána a pepře jsou oproti čistému gelu více zabarveny, ale stále se jedná o příjemnou barvu. Gel z dubové kůry měl lehce nahnědlou barvu, která byla však stále příjemná a přijatelná. Avšak gel připravený ze skořicových liposomů měl již intenzivní oranžovou barvu, tato barva již působí agresivně a navíc je možné, že při aplikaci by tento gel zabarvil i pokožku.



Obrázek 31: Připravené gely

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium antimikrobiálních vlastností vybraných rostlinných materiálů. Cílem práce bylo testování těchto přírodních antibakteriálních látek jako alternativy k antibiotikům, a to zejména pro kosmetické účely a zevní aplikaci.

K analýze bylo vybráno celkem 12 druhů bylin a koření. Z každého vzorku byly připraveny tři typy extraktů – vodné, alkoholové a olejové. Testovány byly extrakty z badyánu, dubové kůry, hřebíčku, kozince, lapacha, lichořeřišnice, muškátového oříšku, oregána, pepře, pomerančové kůry, skořice a zázvoru.

U připravených extraktů byl nejprve sledován obsah aktivních látek. Stanoven byl celkový obsah polyfenolů, celkový obsah flavonoidů a antioxidační aktivita.

Z testovaných extraktů obsahovaly nejvíce polyfenolů olejový extrakt z hřebíčku (65,1 mg/g) vodný extrakt z oregána (36,5 mg/g) a alkoholový extrakt z pepře (39,8 mg/g). Flavonoidů ze všech alkoholových extraktů obsahoval nejvíce extrakt z muškátového oříšku (14,8 mg/g). U vodných roztoků to byl opět extrakt z oregána (22,0 mg/g) a u olejových extraktů měl nejvyšší obsah flavonoidů extrakt zázvoru (31,6 mg/g). Z hlediska antioxidační aktivity pak vynikaly především vodné extrakty. Z jednotlivých rostlin vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu dubová kůra (45,0 mg/g). Dalšími vzorky s vysokou antioxidační aktivitou byly hřebíček, muškátový oříšek, oregáno, skořice a zázvor. Nejnižší aktivita byla naopak zjištěna u pepře a kozince, u kterých byla rovněž zjištěna nízká koncentrace polyfenolů a flavonoidů.

Dále byly všechny testované extrakty enkapsulovány do liposomů. U částic byla následně stanovena velikost, stabilita, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita. Průměrné velikosti liposomů se pohybovaly v intervalu od 100 do 200 nm. Stabilita částic byla testována z hlediska zeta potenciálu a všechny připravené částice byly stabilní. Nejvyšší stabilita byla zjištěna u liposomů s alkoholovým extraktem z muškátového oříšku (-64,9 mV). Nejnižší stabilitu vykazovaly liposomy s vodným extraktem z kozince (-33,0 mV).

Enkapsulační účinnost byla stanovena z hlediska množství enkapsulovaných polyfenolů. Nejvyšší 100% enkapsulační účinnost dosahovaly olejové extrakty z dubové kůry, lapacha a lichořeřišnice. U liposomů z vodných extraktů vykazoval nejvyšší enkapsulační účinnost extrakt z badyánu (99 %), u alkoholových extraktů pak pepř (97 %). Z hlediska enkapsulovaného množství polyfenolů bylo naměřeno nejvíce těchto aktivních látek v liposomech z olejových extraktů zázvoru (2,22 mg/ml) a hřebíčku (2,16 mg/ml), dále pak z vodných extraktů z dubové kůry (2,31 mg/ml) a oregána (2,83 mg/ml) a u alkoholového extraktu z pepře (3,91 mg/ml), skořice (1,14 mg/ml) a oregána (1,05 mg/ml).

Dlouhodobá stabilita liposomů pak byla testována po měsíci skladování ve vodném prostředí při teplotě 5 °C. Z dosažených výsledků lze však konstatovat, že žádné liposomy nebyly dostatečně stabilní a větší množství enkapsulovaných polyfenolů bylo uvolněno do prostředí. Vyšší stabilitu vykazovaly pouze liposomy s olejovým extraktem z pomerančové kůry lichořeřišnice a hřebíčku, dále liposomy s vodným extraktem oregána a liposomy s alkoholovým extraktem z kozince.

Na závěr byly provedeny antimikrobiální testy vůči grampozitivnímu kmenu *Micrococcus luteus* i gramnegativnímu kmenu *Serratia marcescens*, přičemž byla zkoumána antimikrobiální aktivita připravených extraktů i liposomů s jejich obsahem. Obecně lze říci, že enkapsulace extraktů do liposomových částic velmi výrazně navýšila jejich antimikrobiální účinek.

Nejvyšší antimikrobiální účinek proti kmeni *Micrococcus luteus* měly liposomy s obsahem olejových extraktů, až na liposomy z oregána, měly všechny tyto liposomy účinnost nad 70 %.

Také liposomy z alkoholových extraktů z badyánu, hřebíčku, kozince, lapacha, muškátového oříšku a pomerančové kůry vykazovala vysoký účinek s inhibicí nad 70 %.

Proti kmeni *Serratia marcescens* měli antimikrobiální účinek rovněž liposomy s obsahem olejových a alkoholových extraktů. Liposomy s obsahem vodných extraktů měli u obou kmenů nejnižší inhibiční účinek.

Z celkového hlediska byly vůči oběma kmenům nejúčinnější liposomy s obsahem olejových extraktů z kozince, muškátového oříšku a pepře, a z alkoholových extraktů z badyánu a hřebíčku. Tyto liposomové částice by tak mohly být vhodnou alternativou antibiotik a mohou nalézt uplatnění například při aplikaci ve formě různých antimikrobiálních gelů pro kosmetický či farmaceutický průmysl.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry* [online]. Bentham Science Publishers, 0305n. 1., **10**(10), 813-829 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.2174/0929867033457719. ISSN 09298673. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/215094159?OpenUrlRefId=info:xri:ssi:primo&accountid=17115>
- [2] VINŠOVÁ, J. a A. IMRAMOVSKÝ. Salicylanilidy - stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Česká a slovenská farmacie*. 2004, **53**(6), 294 – 299.
- [3] ŠTEFÁNEK, Jiří. *Rezistence na antibiotika*. [online]. [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=rezistence-na-antibiotika>
- [4] VALENTOVÁ, Eva. *Co jsou antioxidanty?*. [online]. [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty>
- [5] TIWARI, Brijesh K., Vasilis P. VALDRAMIDIS, Colm P. O'DONNELL, Kasiviswanathan MUTHUKUMARAPPAN, Paula BOURKE a P.J. CULLEN. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2009, **57**(14), 5987-6000 [cit. 2017-03-09]. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/jf900668n>
- [6] ŠUTA, Miroslav. Biocidy - revize politiky Evropské unie. *EKO - ekologie a společnost*. 2010, **21**(2), 13-14.
- [7] BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 9811, **56**(11), 317-333 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x. ISSN 00296643. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/212310380?OpenUrlRefId=info:xri:sid:primo&accountid=17115#center>
- [8] COWAN, M. M. Plant products as microbial agents. *Clin. Microbiol. Reviews*. 1999, **12**(4), 564 – 582.
- [9] MIDDLETON, E, C KANDASWAMI a T C THEOHARIDES. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* [online]. 0012n. 1., **52**(4), 673 [cit. 2017-03-09]. ISSN 00316997. Dostupné z: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673#abstract-1>
- [10] MORAVCOVÁ, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha 2003, s. 11-91.
- [11] DORMAN, H. J. D. a S. G. DEANS. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 0002n. 1., **88**(2), 308-316 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/ehost/detail/detail?sid=18a2c6f0-6723-42ed-a4ab-710e3606e7dd%40sessionmgr103&vid=0&hid=115&bdata=Jmxhbm9Y3Mmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#AN=5587866&db=a9h>
- [12] ALY, Soher E., Bassem A. SABRY, Mohamed S. SHAHEEN a Amal S. HATHOUT. Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (*Illicium verum*) in vitro. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* [online]. Elsevier B.V,

- 1601, **15**(1), 20-27 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.jssas.2014.05.003. ISSN 1658077X. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jssas.2014.05.003>
- [13] LORENZ, Peter, Miriam HEINRICH, Manuel GARCIA-KÄUFER, et al. Constituents from oak bark (*Quercus robur* L.) inhibit degranulation and allergic mediator release from basophils and mast cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. Elsevier Ireland, 2016, **194**(12), 642-650 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.027. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jep.2016.10.027>
- [14] MOON, Sang-Eun, Hye-Young KIM a Jeong-Dan CHA. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology* [online]. Elsevier, 2011, **56**(9), 907-916 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.005. ISSN 00039969. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.archoralbio.2011.02.005>
- [15] SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in campania (Southern Italy). *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, **44**(5), 1327-1332 [cit. 2017-03-09]. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf950508z>
- [16] Atlas rostlin.cz. [online]. 2010 [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://listnatestromy.atlasrostlin.cz>
- [17] SEGO, Sherril. *Astragalus. The Clinical Advisor: For Nurse Practitioners* [online]. Hawthorne: Haymarket Media, 2015, **18**(7), 95-96 [cit. 2017-03-11]. ISSN 15247317. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1695029219?rfr_id=info%3Axi%2Fsid%3Aprimo
- [18] GÓMEZ CASTELLANOS, J. Rubén, José M. PRIETO a Michael HEINRICH. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)—A global ethnopharmacological commodity? *Journal of Ethnopharmacology* [online]. Elsevier Ireland, 2009, **121**(1), 1-13 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.jep.2008.10.004. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jep.2008.10.004>
- [19] CHRISTENHUSZ, Maarten J. M. 746. TROPAEOLUM MAJUS. *Curtis's Botanical Magazine* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2002, **29**(4), 331-340 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1111/curt.12002. ISSN 13554905. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/curt.12002/full>
- [20] BUTNARIU, Monica a Cristian BOSTAN. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (*Nasturtium*). *African Journal of Biotechnology* [online]. Victoria Island: Academic Journals, 2011, **10**(31), 5900-5909 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.5897/AJB11.264. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1660506105?rfr_id=info%3Axi%2Fsid%3Aprimo
- [21] GUPTA, Ashish Deep, Vipin Kumar BANSAL, Vikash BABU a Nishi MAITHIL. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. Elsevier B.V, 2012, **11**(1), 25-31 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.jgeb.2012.12.001. ISSN

- 1687157X. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.jgeb.2012.12.001>
- [22] JNAID, Y, R YACIOUB a F AL-BISKI. Antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum vulgare* essential oil. *International Food Research Journal* [online]. Selangor: Universiti Putra Malaysia, Faculty of Food Science, 2016, **23**(4), 1706-1710 [cit. 2017-03-11]. ISSN 19854668. Dostupné z:
http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1805759915?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprimo
- [23] MORDEN, Darryl. Pepper. *Hollywood Reporter* [online]. Hollywood: Prometheus Global Media, 2005, **388**(11), 37 [cit. 2017-03-11]. ISSN 00183660. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.chroma.2015.09.065>
- [24] JEENA, Kottarapat, Vijayasteltar B. LIJU, N.P. UMADEVI a Ramadasan KUTTAN. Antioxidant, Anti-inflammatory and Antinociceptive Properties of Black Pepper Essential Oil (*Piper nigrum* Linn). *Journal of essential oil-bearing plants* [online]. Taylor, 2014, **17**(1), 1-12 [cit. 2017-03-11]. ISSN 09765026. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1080/0972060X.2013.831562>
- [25] CHEN, Xiu-Min, Andrew R. TAIT a David D. KITTS. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2017, **218**(3), 15-21 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.016. ISSN 03088146. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.foodchem.2016.09.016>
- [26] KAWATRA, Pallavi a Rathai RAJAGOPALAN. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. *Pharmacognosy Research* [online]. Medknow Publications Pvt, 2015, **7**(5), 1-6 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.4103/0974-8490.157990. ISSN 09748490. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4466762/>
- [27] HAIGH, Charlotte. *The top 100 immunity boosters*. London: Duncan Baird Pub, 2005. ISBN 1844831116.
- [28] UMAR, Muhammad Ihtisham, Aqeel JAVEED, Muhammad ASHRAF, Amjad RIAZ, Muhammad Mahmood MUKHTAR, Sheryar AFZAL a Rabia ALTAF. Polarity-Based Solvents Extraction of *Opuntia dillenii* and *Zingiber officinale* for In Vitro Antimicrobial Activities. *International Journal of Food Properties* [online]. Taylor, 2013, **16**(1), 114-124 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1080/10942912.2010.517886. ISSN 10942912. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1080/10942912.2010.517886>
- [29] TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O'HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* [online]. 9506, **33**(6), 1524 [cit. 2017-03-12]. ISSN 00951137. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228208/>
- [30] TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O'HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* [online]. 9506, **33**(6), 1524 [cit. 2017-03-12]. ISSN 00951137. Dostupné z:
<http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1041221991?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=17115>

- [31] Antimicrobial susceptibility testing protocols. *Scitech Book News* [online]. Portland: Ringgold, 2007, **31**(3), 414 [cit. 2017-03-12]. ISSN 01966006. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/200147135?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprim0
- [32] HERMAN, Anna, Andrzej HERMAN, Beata DOMAGALSKA a Andrzej MŁYNARCZYK. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology* [online]. India: Springer-Verlag, 1306, **53**(2), 232-237 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0. ISSN 00468991. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626961/>
- [33] BASU, Paramita a Camelia MAIER. In vitro antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. *Pharmacognosy Research* [online]. Mumbai: Medknow Publications, 2016, **8**(4), 258-264 [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.4103/0974-8490.188875. ISSN 09764836. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004516/>
- [34] SONIKA, Pandey, Seth AKANKSHA, Tiwari RAJESH, Singh SUNITA, M. Behl H. a Singh SUMAN. Development and evaluation of antimicrobial herbal cosmetic preparation. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2014, **8**(20), 514-528 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.5897/AJPP2013.3967. Dostupné z: <http://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/8B7D29B44724>
- [35] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. Elsevier, 2011, **1**, 1806-1815 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- [36] ZUIDAM, N, Viktor A. NEDOVIĆ. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. NeV York: Springer Science+Business Media, LLC, 2010, 400 s. ISBN 978-144-1910-080.
- [37] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in food science & technology* [online]. 2010, **21**(10), 510-523 [cit. 2017-03-12]. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- [38] Liposome [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/liposome>
- [39] *Encyclopedia of surface and colloid science* [online]. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006, s. 3299-3313 [cit. 2017-03-12]. ISBN 0-8493-9615-8.
- [40] FERNANDES, Gabriel D., Rosana M. ALBERICI, Gustavo G. PEREIRA, Elaine C. CABRAL, Marcos N. EBERLIN a Daniel BARRERA-ARELLANO. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2012, **135**(3), 1855-1860 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.072. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.foodchem.2012.06.072>
- [41] Cholesterol [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://primaleye.uk/understanding-cholesterol-part-1-synthesis-roles-absorption-body/>
- [42] RICKWOOD, D., HAMES, B. D. *Liposomes a practical approach*. IRL-Press Oxford, 1990. pp. 420. ISBN 978-0-19-963654-9.
- [43] LASIC, D. D. *Liposomes in gene delivery*. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091.

- [44] MOSS, Frank a Stan GIELEN. *Neuro-informatics and neural modelling: Handbook of Biological Physics*. 1st ed. New York: Elsevier, 2001, xix, 1059 p. ISBN 04-445-0284-X.
- [45] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [46] © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [47] TROGL. *NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE*. 2008. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>. Skriptum. UJEP.
- [48] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 8024612704.
- [49] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605449.
- [50] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 8020006001.
- [51] LEIPOLD, F.: Inactivation of microorganisms by means of low temperature atmospheric pressure plasma. In *28th ICPIG*, Praha, 15. – 20. července 2007 [online]. 2007 [cit. 2017-03-30].
- [52] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, a.s., 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [53] *Serratia* spp.: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://www.phacaspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/serratia-spp-eng.php>
- [54] HEJAZI, A., F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, vol. 46, issue 11, s. 903-912 [cit. 2015-04-08]. DOI:10.1099/00222615-46-11-903.
- [55] *Micrococcus*: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://www.phacaspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>
- [56] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, c2005. ISBN 8072623419.
- [57] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. In: *Chemické listy*. 2004, s. 174-179. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS – 2,2–azinobis(3–ethylbenzothioazolin-6-sulfonoová kyselina)

DLS – dynamický rozptyl světla

ZP – zeta potenciál

NB – Nutrient Broth

PCS – fotonová korelační spektroskopie

UV oblast – ultra fialová oblast

MIC – minimální inhibiční koncentrace